

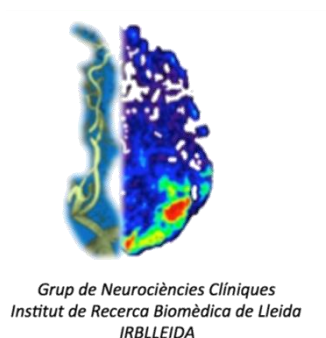
FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ IMPLICATS EN EL FENOMEN DE TOLERÀNCIA ISQUÈMICA EN CÒRTEX DE RATOLÍ ADULT

Arabela Sanz Alcázar

Tutors: Serafí Cambray i Francesc Purroy

Grau de Biotecnologia

18/01/2017



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària

1. Índex

1.	Índex	2
2.	Llista de sigles i acrònims:.....	3
3.	Agraïments:	4
4.	Resum:	5
5.	Introducció:.....	6
5.1.	La problemàtica de les MCV:.....	6
5.2.	Què és un ictus?.....	6
5.3.	La tolerància isquèmica, font de futures teràpies:	7
5.4.	Experiments previs:	9
6.	Objectius:.....	13
7.	Material i mètodes:	14
7.1.	Disseny experimental:	14
7.2.	Model murí de preconditionament:	14
7.2.1.	Estabulari:	14
7.2.2.	Cirurgia i condicionament:	15
7.2.3.	Perfusió:.....	15
7.2.4.	Re-fixació i crioprotecció del cervell:	16
7.3.	Immunofluorescència:	16
7.3.1.	Processament dels talls: criostat	16
7.3.2.	Llistat d'anticossos utilitzats:	16
7.3.3.	Protocol d'immunofluorescència:	16
7.3.4.	Microscòpia confocal i de fluorescència:	17
7.3.5.	Quantificació:	18
7.4.	Western Blot:.....	18
7.4.1.	Quantificació:	19
7.5.	Anàlisi estadístic:.....	19
8.	Resultats:	20
8.1.	Expressió nuclear dels FTs després del condicionament isquèmic:.....	20
8.2.	Possible "rol en la vasodilatació" degut a l'expressió dels FTs en vasos:	29
8.3.	Taula resum dels resultats:.....	35
9.	Discussió:.....	36
10.	Limitacions:.....	41
11.	Conclusions:	41
12.	Bibliografia:	42
13.	Annexos:	46

2. Llista de sigles i acrònims:

- ACM: Arteria Cerebral Mitja
- AIT: Atac Isquèmic Transitori
- AP-1: activador de la proteïna-1
- SB: Solució de Bloqueig o *Blocking solution*
- BSA: *Bovine Serum Albumin*
- DMO o *Dmrta1 (Doublesex and mab-3 related transcripcion factor like family A1)*
- FT: Factor de Transcripció
- IEG: *Immediate early genes*
- IF: Immunofluorescència
- IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*
- MCV: Malalties Cerebrovasculars
- Mef2: *Myocyte enhancer binding factor 2*
- NFK β -p65: *Nuclear Factor NF-kappa-B p65 subunit* o RELA
- NppC: *Natriuretic peptide precursor C*
- OCT: *Optimal Cutting Temperature*
- PBS: *Phosphate Buffered Saline*
- PBS-T: *Phosphate Buffered Saline-Tween20*
- PFA: Paraformaldehid
- SNC: sistema nerviós central
- TA: Temperatura Ambient
- Tbx5: T-box transcription factor 5 o HOS
- TI: Tolerància Isquèmica
- TRANSFAC: *TRANScriptioFACtor data base*
- WB: Western Blot
- Znf238: *Zinc fingerprotein 238*, ZBTB18, C2H2-171, MRD22, RP58 o TAZ-1
- Znf384: *Zinc fingerprotein 384*, CAGH1, CAGH1A, CIZ, ERDA2, NMP4, NP o TNRC1

3. Agraïments:

Primerament, agrair molt especialment al Dr. Serafi Cambray i al Dr. Francesc Purroy, investigadors principals del grup de *Neurociències Clíiques* de l'IRB-Lleida i tutors d'aquest Treball Final de Grau, per haver fet possible l'elaboració d'aquest projecte. No només per la seva orientació, paciència, bon tracte, sinceritat i passió que van estendre en mi, sinó sobretot per la seva increïble professionalitat i dedicació amb la que porten el grup de *Neurociències Clíiques*, aspecte que més admiro.

Donar les gràcies també al grup de *Neurociències Clíiques* per deixar-me incorporar en el seu laboratori i fer-me sentir com una més d'ells.

També dono les gràcies a Laura Colàs, per mostrar-me noves tècniques des de la meua primera estància i fins ara, a seguir facilitant-me ajuda quan ho necessitava. A Anaïs Marsal per la seva ajuda i amabilitat, i per acompanyar-me en aquesta experiència. A Marta Valverde i Maria Arbaizar per ajudar-me amb les quantificacions de les imatges obtingudes. A Ikram Benabdelhak per donar-me ànims quan ho necessitava. A Tània Cemeli per ajudar-me amb els Westerns Blot, i a Montse Ortega per alegrar i donar-li un toc més roquer al laboratori.

Per últim agrair als meus pares i als meus amics per recolzar-me en tot moment i fer que tot sigui més fàcil.

4. Resum:

Les malalties cerebrovasculars (MCV) són la segona causa de mort i la principal de discapacitat a nivell mundial, dades extrapolables a Catalunya, on suposen la tercera causa de defuncions (la primera en dones). Tot i això no hi han fàrmacs capaços de mitigar la mort neuronal post ictus.

El grup de *Neurociències Clíiques* va desenvolupar un protocol de tolerància isquèmica (TI) per identificar mecanismes de neuroprotecció endògens. Van obtenir mostres de còrtex de ratolins condicionats i mitjançant *arrays* van analitzar-ne el nivells d'mRNA comparant-los amb ratolins control. Un anàlisi dels promotors dels gens alterats va mostrar que 8 Factors de Transcripció (FT) controlen fins el 80% dels gens expressats diferencialment. Quatre d'aquests ja havien estat implicats en el mecanisme de TI (NFK β -p65, c-Fos, c-Jun i Mef2), mentre que els altres quatre (DMO, Znf348, Znf238, Tbx5) no s'hi havien relacionat.

El present treball pretén validar mitjançant immunofluorescència i Western Blot els resultats dels anàlisis bioinformàtics. Per fer-ho es van condicionar 6 ratolins (3 per IF i 3 per WB) que van comparar-se amb 6 controls (3 IF i 3 WB). Totes les mostres van recollir-se a les 24 hores post-cirurgia.

Els resultats mostren una expressió de DMO i Znf238 en vasculatura cerebral dels ratolins condicionats, i el primer, a més, es troba incrementat en les neurones corticals de capa superficial. També es va poder comprovar que el fenomen de TI influïa en dos vies, d'una banda incrementava tant el nombre com el diàmetre dels vasos cerebrals, i d'altra el còrtex mostrava nivells més alts del receptor de glucosa Glut-1 i de GAPDH, dos proteïnes claus en el metabolisme de la glucosa.

En conclusió, el present treball ha identificat que en el fenomen de TI intervenen tant un increment del flux sanguini al cervell com un increment en la captació i el metabolisme de la glucosa, cosa que permetria una major supervivència de les neurones en cas d'ictus. A més s'han identificat dos nous FTs presents en els vasos només en ratolins condicionats, que podrien regular gens implicats en vasodilatació i/o el metabolisme de la glucosa.

5. Introducció:

5.1.La problemàtica de les MCV:

Les malalties cerebrovasculars (MCV) són una de les malalties neurològiques més comuns arreu del món. A nivell mundial, l'ictus és la segona causa de mort en majors de 60 anys i la cinquena en persones d'entre 15 i 59 anys d'edat, segons les dades de la *World heart federation*¹. L'organització Mundial de la Salut (OMS) situa la incidència mundial de la malaltia al voltant de 200 casos nous per cada 100.000 habitants/any.

A Espanya, s'estima que la incidència de l'ictus és d'entre 132-174 casos per 100.000 habitants/any (Martínez-Vila, Murie Fernández, Pagola, & Irimia, 2011). Mentre que a Catalunya segons les dades més recents publicades pel Departament de Salut de la Generalitat, és la segona causa de mort a Catalunya, causant 3.464 morts, un 6,29% del total de defuncions. Aquestes dades són especialment rellevants per a les dones, que amb 2.202 defuncions suposen un 60% de les morts causades per les MCV. No menys important que l'elevada mortalitat és el fet que l'ictus suposa la primera causa de discapacitat. Aquesta dada és especialment significativa en l'àmbit de Catalunya, on segons el Departament de Treball, Afers Socials i Família de la Generalitat, el nombre de persones amb discapacitat mostra una continuada tendència a l'alça, suposant un 4,22% del total de la població al 2001, un 5,88% al 2010 i un 6,85% al 2015. A banda de la problemàtica social causada per les MCV, també cal destacar l'impacte econòmic que aquestes suposen per la societat catalana. El cost sanitari directe del primer any d'ictus suposa uns 15.268€/pacient, però el cost indirecte de la cura dels pacients és encara més elevat situant-se en els 21.500€ anuals per pacient. Això és degut a que un 90% dels ictus acaben deixant seqüeles, on en un 35-45% dels casos comporten una incapacitat de les persones afectades. Aquesta despesa es veu agreujada pel fet que més del 25% dels ictus afecten a la població activa (Martínez-Vila et al., 2011).

5.2.Què és un ictus?

L'ictus consisteix en una interrupció sobtada del flux sanguini en una zona del cervell. El subtipus més freqüent és l'ictus isquèmic, que representa un 85% de tots els casos, i es produeix per l'estenosi o oclusió trombòtica d'una arteria intracraneal o extracraneal. Aquest esdeveniment provoca una pèrdua d'oxigen i glucosa al teixit cerebral i com a conseqüència, es produeix una mort neuronal. L'altre tipus, amb un 15% dels casos, és

¹<http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/stroke/>.

l'ictus hemorràgic o vessament cerebral hemorràgic, que és el resultat del trencament de manera espontània (no traumàtica) d'un vas sanguini del cervell (Go et al., 2013; Martínez-Vila et al., 2011).

Quan els ictus són de curta durada (menys de 24 hores), se'ls anomena Atacs Isquèmics Transitoris (AITs). Tot i que no solen deixar seqüeles neurogèniques greus, augmenten el risc de patir un ictus posterior en un 15-20% dels casos, pel que es pot utilitzar com una eina pronòstica (Johnston & Hill, 2004).

Actualment, l'únic fàrmac aprovat pel tractament de la fase aguda de l'infart cerebral és la trombòlisi amb activador del plasminogen tissular. Més recentment, la trombectomia mecànica també s'ha afegit al tractament en fase aguda. Recents estudis, mostren que els millors resultats s'aconsegueixen combinant les dues tècniques (Ding, 2015).

5.3.La tolerància isquèmica, font de futures teràpies:

Abans de l'era de la trombòlisi, els assajos clínics en la prevenció de l'ictus i posterior neuroprotecció eren més freqüents (Ginsberg, 2009). La neuroprotecció és una estratègia terapèutica que intenta salvar les neurones un cop ha esdevingut l'ictus o lesió. La investigació preclínica de molts agents farmacològics amb diferents mecanismes d'acció, ha demostrat un efecte neuroprotector en models animals d'accident cerebrovascular (O'Collins et al., 2006), però fins ara cap ha pogut ser traslladat a la clínica (Chamorro et al. 2016). Atès que els tractaments neuroprotectors no han aconseguit encara beneficis adequats, es fa imprescindible la recerca de noves alternatives (Budincevic et al., 2015).

Els models d'isquèmia cerebral global i focal han proporcionat evidències de la inducció d'un fenomen de "tolerància isquèmica". En animals prèviament sotmesos a episodis d'isquèmia curts (precondicionament isquèmic), el cervell és més tolerant a subsegüents isquèmies cerebrals. Aquest fenomen es va observar inicialment en la regió CA1 de l'hipocamp, però posteriorment també s'ha comprovat en altres regions de l'hipocamp, en l'escorça, el tàlem i ganglis basals fronto-parietal (Moncayo et al., 2000).

Tot i que el fenomen de la TI ha estat molt estudiat en models de rosegadors i de cultius cel·lulars neuronals, l'evidència emergent indica que la TI és una forma evolutivament conservada de la plasticitat cerebral que es produeix en invertebrats i vertebrats, on

estan inclosos els humans (Gidday, 2006), cosa que fa el model especialment atractiu per la recerca de possibles teràpies neuroprotectores.

Partint dels estudis en models animals d'isquèmia focal transitòria limitada al territori de l'ACM, s'ha vist que els pacients amb un infart cerebral que prèviament han tingut un AIT ipsilateral, presenten un quadre neurològic menys greu i, en conseqüència, un millor pronòstic respecte als pacients amb un ictus sense AIT previ. Això fa pensar que el fenomen de TI pot ser quelcom extrapolable a la clínica (Moncayo et al., 2000; Zsuga et al., 2008).

Tot i que les cèl·lules cerebrals ja presenten una sèrie de respostes a la isquèmia per tal de mitigar la lesió i la mort cel·lular (Sapolsky, 2001), el fenomen de TI les incrementa i en suma d'altres. La TI no només incrementa el flux sanguini, sinó que també incrementa tant la neuroprotecció endògena (induint l'expressió de gens inhibidors d'apoptosi o reguladors del metabolisme), com la exògena (alliberant substàncies neuroprotectoreso vasodilatadores). La TI, a més, presenta dues fases temporals, una primerenca amb efectes als pocs minuts post-precondicionament, que dura unes poques hores i independent de la síntesi de proteïnes, i una de tardana que apareix passades les 12-24 hores del preconditionament, que dura de 7 a 14 dies i depenent de la síntesi de proteïnes (Dirnagl, Becker, & Meisel, 2009).

El perfil d'expressió de l'activació i/o repressió de gens posats en moviment pel preconditionament, no és només específicament temporal, si no que també difereix entre les neurones, la glia i les cèl·lules endotelials. Per millorar la resistència del cervell a la isquèmia s'activen diverses famílies de gens juntament amb la modificació d'algunes proteïnes (Gidday, 2006; Ma et al., 2016).

A més, pel que fa a la resposta a la lesió isquèmica, el preconditionament no es limita a activar els mecanismes de competència per contrarestar aquestes cascades de lesions (Gidday, 2006), sinó que activa diferents mecanismes implicats en la disminució del dany neuronal: la regulació immunitària, la inflamació, l'apoptosi, l'autofàgia, la vasculogènesi, la vasodilatació, l'augment de la pressió sanguínia, la neurogènesi i el metabolisme de la glucosa (Figura 1; Iadecola & Anrather, 2011).

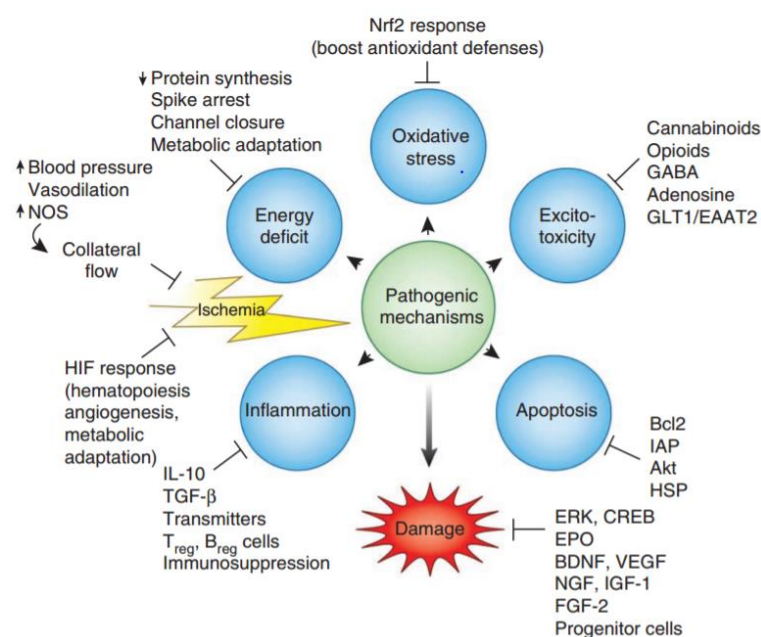


Figura 1. Mecanismes patològics involucrats en la neuroprotecció enfront l'ictus (Iadecola & Anrather, 2011)

A nivell molecular el fenomen de neuroprotecció es desencadena a través de mòduls de sensors, transductors i efectors (Figura 2).

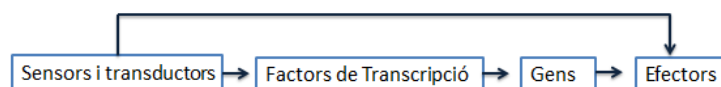


Figura 2. Cascada de senyalització del pre-condicionament isquèmic.

Per incitar la tolerància, l'estímul del preconditionament (falta d'oxigen, glucosa, etc.) ha de ser reconegut pels sensors, com un signe d'avís, i aquests han d'activar les vies de transducció, a través de proteïnes transductores (com NFK β , JAKs o STATs). Aquests transductors solen causar l'activació de FTs que promouran o inhibiran la transcripció de diferents gens i proteïnes que actuaran com a efectors d'aquesta cascada. Els efectors són produïts *de novo* com a resultat de canvis de l'expressió gènica generalment regulada per FTs o proteïnes regulades mitjançant modificacions post-traduccionals (Gidday, 2006).

5.4. Experiments previs:

El laboratori de Neurociències Clínicas de l'IRB-LLEIDA va desenvolupar un protocol de TI, on va obtenir unes mostres de teixit cerebral i va fer anàlisis d'expressió de mRNA abans, durant i fins les 24 hores després de l'infart cerebral en mostres de ratolí condicionat comparant-les amb ratolins control. Utilitzant els softwares d'anàlisi massiu de dades, *Transfact* i IPA, es va posar de manifest que 24 hores després del

condicionament i abans d'un infart cerebral, únicament vuit FT controlen fins el 80% dels gens expressats diferencialment degut al condicionament isquèmic, dels quals quatre, ja havien estat identificats prèviament com a mediadors del mecanisme de TI.

En aquest Treball Final de Grau, s'intenta validar mitjançant immunofluorescència i Western Blot els FTs identificats mitjançant eines bioinformàtiques, i mirar en quin dels mecanismes implicats en el fenomen de la TI intervenen.

Aquests factors de transcripció són:

- **NFK β - P65:**

En l'anàlisi de promotors de gens inhibits l'únic FT sobrerrepresentat va ser el RelA/NFK β -p65, que recentment s'ha demostrat que és important per la TI. En l'estudi de Liang et al. es va demostrar que la protecció del preconditionament isquèmic, causada per un atac isquèmic transitori, està associada amb l'atenuació de l'activació del FT NFK β -p65 en les neurones (Liang et al. 2014).

- **Tbx5:**

Tbx5 forma part de les proteïnes T-box que tenen funcions importants en la memòria descriptiva, i en el desenvolupament inicial de les potes davanteres i darreres dels vertebrats. És el primer factor determinant de llinatge cardíac en vertebrats, i la seva manca o mutació causa defectes en la formació tant de les extremitats com del cor (Bruneau et al 2001). Durant el desenvolupament cardíac, Tbx5 mostra canvis dinàmics en la localització en resposta a diferents estímuls, dels que són nuclears estrictament, als que són nuclears-citoplasmàtics, i als que són exclusivament citoplasmàtics al llarg del citoesquelet d'actina en les cèl·lules que coexpressen la proteïna d'unió LMP4 (Kulisz & Simon, 2008).

- **Znf384:**

La proteïna de "dits de zinc" 384 (Znf384) és un factor de transcripció que regula els promotors dels gens de la matriu extracel·lular i és conegut per estar involucrat a través de la fusió amb els gens de la família TET, com ara el sarcoma d'Ewing, la proteïna TATA-box associada al factor i el factor de transcripció 3 (Hirabayashi et al., 2017).

- **Znf238:**

Znf238 o també conegut com RP58, és un factor de transcripció que actua a nivell molecular com activador/repressor de la transcripció i està implicat en l'empaquetament de la cromatina. Aquest FT, regula la transició multipolar de les neurones embrionàries durant el desenvolupament de l'escorça cerebral, és a dir, la seva expressió augmenta gradualment en paral·lel amb la maduració neuronal (Hirai et al., 2012). Dins del sistema nerviós, la pèrdua de RP58 condueix a una anormal neurodiferenciació i a la proliferació de progenitors en el neocòrtex (Ohtaka-Maruyama et al., 2013).

- **DMO:**

DMO o Dmrt1 és un factor de transcripció el qual s'ha vist expressat en progenitors neuronals, on regula l'expressió de gens proneurals, per tant, es pot dir que regula la neurogènesi. S'expressa inicialment a la cresta neural anterior i després es restringeix progressivament a una part del telencèfal (Kikkawa et al., 2013), i juga un paper important en la determinació del sexe i diferenciació en *Drosophila melanogaster*, nematodes, *Oryzias latipes* i ratolins (J. Wang et al., 2014).

- **Mef2:**

Mef2 és un membre de la família MADS box, que està principalment involucrat en la diferenciació del múscul, però també està implicat en trastorns cardiovascular i neuronals. S'ha demostrat que la senyalització d'ERK5-MEF2C juga un paper crític en la mediació de les accions anti-apoptòtiques i neuroprotectores en el preconditionament isquèmic (R. M. Wang et al., 2009).

- **C-Jun i C-Fos:**

Els membres de la família c-Jun i c-Fos són els prototips de gens primerencs immediats (IEGs) que serveixen com a factors de transcripció i codifiquen per a proteïnes que ajuden a regular el creixement i la diferenciació cel·lular (An et al., 1993; Cveti, 2016). Ambdós FT són membres del complex AP-1, que comprèn Jun (C-Jun, Jun-B, i Jun-D), Fos (c-Fos, Fos-B, Fra -1, i Fra-2), Maf (fibrosarcoma musculoaponeuròtic), i ATF (factor activador de la transcripció).

La sobreexpressió del gen de c-Jun no només estimula la transcripció, sinó que també regula diversos efectes fisiològics i patològics. L'activació de c-Jun està regulat per la

fosforilació, ja sigui de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) o de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPKs)(Shi, Zhao, Fu, & Qiu, 2016). La via intracel·lular JNK està regulada en resposta a la isquèmia cerebral, la qual cosa porta a l'activació de factors de transcripció apoptòtics i inflamatoris. D-JNKI1 és un inhibidor de JNK selectiu que protegeix cultius neuronals contra l'excitotoxicitat i indueix un alt grau de neuroprotecció en diversos models d'isquèmia cerebral, tant *in vitro* com *in vivo* (Benakis, Vaslin, Pasquali, & Hirt, 2012).

Tot i que el paper de l'activació del gen c-Fos i la proteïna c-Fos en el SNC no està completament clar fins al moment, la seva expressió ha estat utilitzada com un marcador per a la investigació sobre l'activitat neuronal en diferents àrees del cervell (Cveti, 2016), i diversos estudis han demostrat que c-Fos i els seus productes gènics participen en la lesió neuronal, encara que aquests estan implicats en la inducció de gens d'apoptosi que condueixen a la mort cel·lular, i la seva expressió s'ha demostrat que és essencial per a la recuperació de la isquèmia (Cho et al., 2001).

Donat que Mef2, c-Jun i c-Fos, ja han estat descrits prèviament (Benakis et al., 2012; Cho et al., 2001; R. M. Wang et al., 2009) com a mediadors del mecanisme de TI, es prescindirà de la seva validació en còrtex de ratolí adult a partir del model murí de preconditionament utilitzat en aquest treball.

6. Objectius:

Aquest Treball Final de Grau, està enfocat en l'estudi dels FTs que regulen els gens implicats en el mecanisme de neuroprotecció davant la isquèmia cerebral, per poder identificar, en un futur, noves dianes terapèutiques en front l'ictus.

Els objectius generals i específics són els següents:

- 1) Validar les prediccions dels programes bioinformàtics a partir dels resultats dels *arrays* de mRNA, de manera que s'esperarien diferències rellevants en l'expressió i/o localització entre els grups condicionats i els grups shams.
 - a. Donat que són FTs inferits a partir de l'expressió de gens, s'espera observar una translocació nuclear-citoplasmàtica, un augment de la seva expressió o una aparició en els nuclis de les neurones dels cervells condicionats.
- 2) Descriure en quins mecanismes mediadors de la TI participen els FTs identificats.

7. Material i mètodes:

7.1. Disseny experimental:

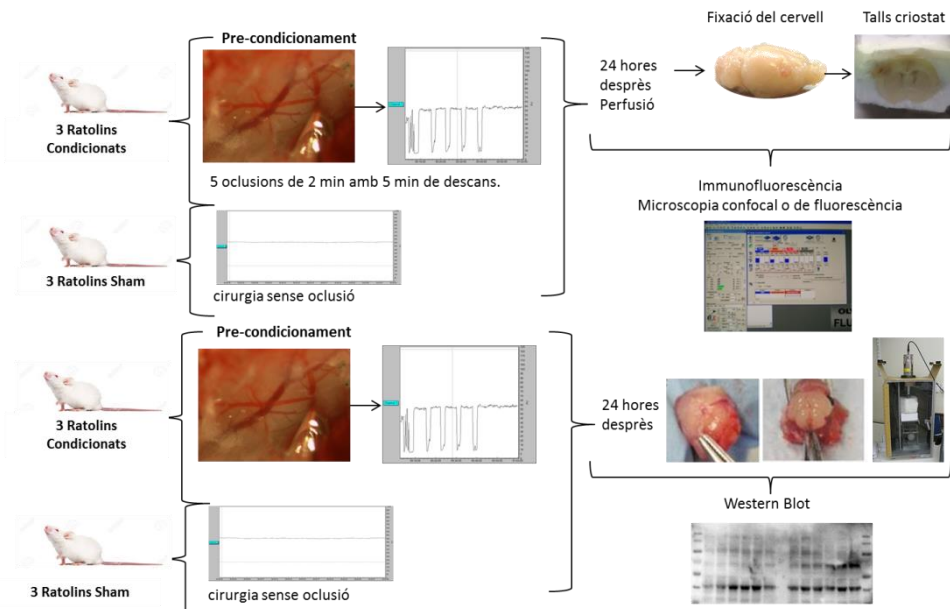


Figura 3. Disseny experimental que s'ha seguit en aquest treball.

Per veure l'expressió en còrtex de ratolí dels diferents FTs en TI es va dissenyar un experiment amb dos grups d'animals, condicionats i shams, els quals van ser sotmesos a una cirurgia on es van realitzar 5 oclusions en l'ACM de dos minuts amb 5 minuts de descans per dur a terme el pre-condicionament. Es van utilitzar 12 ratolins mascles adults de la soca CD1 que pesaven entre 37 i 42 grams. Un cop obtingudes les mostres de teixit cerebral, es va analitzar l'expressió dels FTs mitjançant immunofluorescència i microscòpia confocal o de Fluorescència, o be mitjançant Western Blot (Figura 3).

7.2. Model murí de preconditionament:

El model murí de preconditionament s'aconsegueix realitzant oclusions a l'ACM amb un capil·lar de vidre amb la punta romba i amb un làser Doppler amb fibra òptica es controla la caiguda del flux sanguini.

7.2.1. Estabulari:

Els ratolins estaven allotjats sota unes condicions de llum diürnes, i tenien 12 hores de llum i 12 hores de foscor amb una TA de 18 a 21°C i una humitat relativa del 70-80 %. Tenien lliure accés a pinço i aigua.

7.2.2. Cirurgia i condicionament:

Els ratolins es van anestesià amb isofluorà al 5% en una cambra tancada. Un cop adormit (per comprovar-ho es poden tocar les extremitats inferiors), es va fixar a un esterotàctic (*Standard StereotaxicFrame, Stoelting, USA*) i a sota se li va ficar una manta tèrmica amb una sonda rectal per tal de mantenir la temperatura a 37°C. En una de les extremitats se li va ficar un pulsioxímetre (*MouseOx Plus, STARR, USA*) per poder controlar els batecs del cor i la saturació d'oxigen a través d'un monitor de pantalla.

Primer es va fer una incisió d'un o dos centímetres a la pell del crani del ratolí, exposant el múscul temporal. A continuació es va separar amb l'ajuda d'un bisturí el múscul temporal, i després amb un microtaladre es va treure una porció d'ós escamós, de manera que va quedar exposada l'ACM. Després, es va adherir un cable de fibra òptica del làser Doppler (*Periflux PF2B, Perimed, Suècia*) al territori distal de la l'ACM.

Per fer el preconditionament, es van utilitzar 12 ratolins adults de 2-3 mesos d'edat, dels quals 6 ratolins es van condicionar, és a dir, es van fer 5 oclusions de 2 minuts (provocant una caiguda del flux sanguini d'entre el 70-80%) a l'ACM amb 5 minuts de descans entre oclusió. Els altres 6 ratolins (ratolins sham; amb cirurgia però sense oclusió) es van sotmetre a la cirurgia i amb una lleu pressió al parènquima cerebral adjacent a l'ACM per tal de que no hi hagués una caiguda del flux sanguini però sí un possible estrès mecànic. Tots els ratolins es van perfondre a les 24 hores post-cirurgia (Arsava, Gurer, Gursoy-Ozdemir, Karatas, & Dalkara, 2009).

7.2.3. Perfusió:

El ratolí es va anestesià amb 100µL de Ketamina-Xilacina per 10g/animal (protocol perfusió 13.3.3, Annex). Un cop adormit, es va immobilitzar panxa amunt en un suport mitjançant agulles a cada extremitat, de manera que quedés ben estirat. Tot seguit es va tallar la pell i es van tallar per la meitat les costelles per tal de veure bé el cor i que sigués accessible. A continuació, es va clampar l'aorta descendent, es va clavar una xeringa de 5mL, d'una solució de NaCl al 0,9%, al ventricle esquerre i es va tallar l'aurícula dreta (protocol perfusió 13.3.3, Annex) i molt lentament es va introduir el seu contingut, de manera que es va començar a veure com el fetge es va ficar blanc. Seguidament es va canviar l'agulla i es va fer passar una solució de 5mL de PFA al 4% (protocol perfusió 13.3.3, Annex) que és una solució de fixació.

7.2.4. Re-fixació i crioprotecció del cervell:

Una vegada es va extreure el cervell, es va ficar amb PFA al 4% tota la nit, després es va rentar i es va posar sobre una solució de sacarosa-PBS al 30% (protocol fixació cervell 13.3.4, Annex) fins que precipiti (tota la nit). Un cop precipitat, es van fer rentats, primer amb PBS1x, després amb PBS1x i OCT (1:1) i finalment es va ficar amb OCT (agent crioprotector; *O.C.T.™ COMPOUND CONTAINING, Tissue-Tek®*) al 100%, es va passar a un criomòtille i es va emmagatzemar al congelador de -80°C.

7.3. Immunofluorescència:

7.3.1. Processament dels talls: criostat

Per l'obtenció de talls fins es va emprar el criòstat *Leica CM1950*. El teixit, en el nostre cas, cervell, es trobava congelat, i el que es va fer es treure'l del mòtille i enganxar-lo amb OCT en un suport del criòstat que ens donava certa llibertat de moviment per orientar el teixit i obtenir-ne seccions concretes. Primer de tot es va seleccionar el gruix dels talls (16 µm) i després es va piramidar el tall (consisteix en eliminar tot el OCT del voltant del teixit per facilitar el tall de la ganiveta). Els cervells es van posar en posició antero-posterior per obtenir talls coronals. Un cop obtinguts els talls, sense treure'ls del criostat, es va apropar un portaobjectes (*SUPERFROST PLUS GOLD®*, *Thermo Scientific*) a TA perquè l'OCT es desfés i facilités l'adhesió. Quan es fica la mostra (cervell), l'hemisferi afectat (el qual ha patit la cirurgia) queda a l'esquerra. D'aquesta manera es va facilitar la posterior identificació de les zones condicionades.

7.3.2. Llistat d'anticossos utilitzats:

Els FTs es van identificar en estudis previs fets al Laboratori de *Neurociències Clíniques* (descriu prèviament) i també es van posar a punt els protocols d'IF per tal de poder visualitzar-los en còrtex de ratolí. A partir d'aquí, en el treball actual, es va comparar l'expressió diferencial dels FTs dels grups controls amb els grups condicionats (Llistat anticossos 13.1, Annex).

7.3.3. Protocol d'immunofluorescència:

Un cop processats els talls en els portaobjectes es van agafar 7 portaobjectes, un de cada cervell, amb 13 talls que cobrien tot el cervell al llarg de l'eix antero-posterior, per fer-ne immunofluorescències. Primerament es van rentar els portaobjectes amb 1mL de PBS1x. Es van reficar amb 1mL de PFA al 4% durant 5 minuts a TA. Es va tornar a rentar durant 5 minuts amb PBS1x. Es van submergir els portaobjectes en una solució freda de Metanol-Acetona (1:1) durant 5 minuts a -20°C. Després es va fer un rentat de

PBS1x. Es va bloquejar i es va permeabilitzar amb la SB durant 30 minuts a TA. Posteriorment es va incubar tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari (1:200) diluït amb una solució 1:5 de la SB. En aquest cas veure a la taula annex 13.1.

Al dia següent es va rentar 3 vegades amb PBS1x i es va incubar durant 30 minuts a la foscor amb l'anticòs secundari (1:500) diluït amb una solució 1:5 de la SB. Per a evitar creuaments d'anticossos, els anticossos secundaris solen ser d'ase. En aquest cas veure a la taula Annex 13.1. Acte seguit, després de la incubació amb els anticossos secundaris es va rentar cinc vegades amb PBS1x i el DAPI (pels nuclis) es va afegir juntament amb el medi de muntatge (*SlowFade[®] Gold antifade reagent with DAPI, Life technologies*). Es va tapar amb un cobreobjectes (*Cover Slips, KnittelGlass*), es va segellar amb pinta ungles per tal de que el medi de muntatge no es perdés i no es mogués la preparació quan es va ficar al microscopi.

7.3.4. Microscòpia confocal i de fluorescència:

Les mostres histològiques es van observar amb el microscopi confocal *Olympus Fluoview FV1000*, un microscopi de làser multi fotònic que permet generar imatges de fluorescència a major profunditat de camp gràcies a la penetració de la llum infraroja (IR) i dels objectius de llarg a distància de treball. Aquest microscopi presenta un revolucionari sistema SIM Scanner, que consisteix en realitzar escombrats de làser sincronitzats, i mentre s'excita la mostra es pot veure a la pantalla una imatge d'alta resolució. Totes les imatges del microscopi confocal es van fer a 40x i 60x amb oli d'immersió i es van fer *Z stacks* (escombrat XYZ que consisteix en una sèrie d'imatges confocals XY registrades a través de tot l'espessor de la mostra) de +3 a -3 movent 1 µm cada cop. És a dir, de cada camp es van obtenir 6 imatges representatives d'una zona amb 6 µm de profunditat.

Paral·lelament també, es va utilitzar el microscopi de fluorescència *Olympus BMX51/52 Fluorescence* a 4x per obtenir unes 20 imatges per cervell (a través del programa *DP Controler* i *DP Manager*) i poder tenir la visió dels cervells sencers.

El mapeig i la captura d'imatges es va fer des del final del cos callós fins arribar a les meninges per cada hemisferi de cada tall del cervell (Figura 4). D'aquesta manera es van obtenir seccions complertes dels còrtex i es va evitar un possible biaix pel fet d'estudiar diferents regions. Una anotació important és que es van fer servir els mateixos *Settings* per totes les mostres amb el mateix anticòs i que tots els portaobjectes

van ser processats en paral·lel amb els mateixos tampons i dilucions d'anticossos (per cada FT).

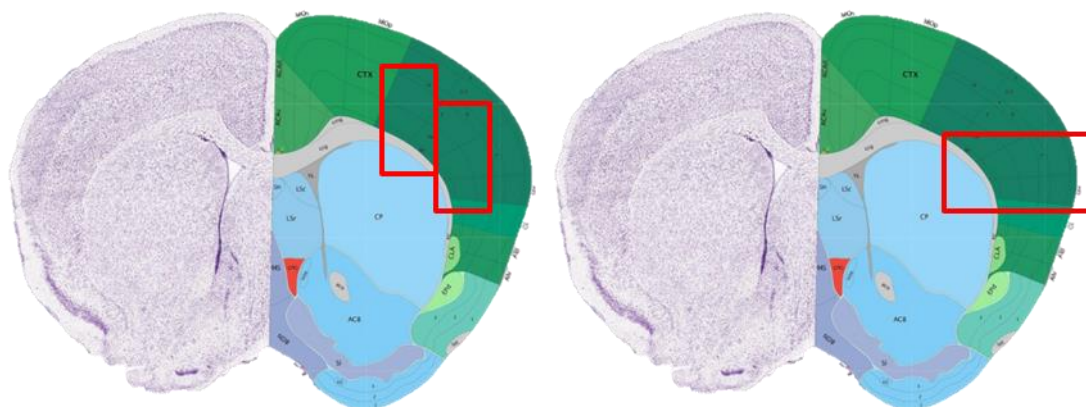


Figura 4. Localització dels talls de les immunofluorescències en el microscopi confocal.

7.3.5. Quantificació:

La quantificació dels nuclis i dels FTs de les imatges obtingudes amb el microscopi confocal per al posterior anàlisi estadístic, es va fer mitjançant l'eina de comptatge del programa ImageJ.

7.4. Western Blot:

Es van sotmetre els ratolins a condicionament isquèmic (3 ratolins condicionats i 3 ratolins sham) i passades 24 hores es van extreure els cervells. Sota la lupa de dissecció (i en fred per evitar la degradació de proteïnes) van separar meninges, còrtex superficial (3-4 mm superiors) i còrtex profund (dels 4 mm fins al cos callós). Un cop realitzada la preparació de les mostres (Protocol preparació de les mostres 13.3.4, Annex) es van desnaturalitzar durant 5 min a 95°C. Seguidament, les proteïnes van ser separades per electroforesi (3 gels a 60mA durant 60 minuts), i posteriorment es va realitzar la seva transferència a una membrana de PVDF, prèviament, submergida en metanol per fer-la hidrofílica i millorar-ne la capacitat d'unir proteïnes. Una vegada realitzada la transferència de les proteïnes (60 minuts a 180mA), es va bloquejar la membrana amb BSA al 3% en 50mL de PBS-T (Protocol WB 13.3.2, Annex) per tal d'evitar possibles unions inespecífiques. Finalment, es va dur a terme la incubació amb els anticossos primaris (Llistat d'anticossos 13.2, Annex), i els anticossos secundaris (1/10000) dirigits contra les espècies anteriors i sensibles al substrat HRP (*Horseradish Peroxidase*).

Entre l'anticòs primari i l'anticòs secundari es van realitzar tres rentats: el primer de 15 minuts amb PBS-T, 5 minuts amb PBS-T i 10 minuts amb BSA al 0,3%, i tres rentats finals de 10 minuts amb PBS-T.

Com a control de càrrega es va utilitzar Blau de Coomassie.

A l'hora de revelar es van utilitzar reactius de ImmobilonTM Western, *chemiluminescent HRP substrate*, de MILLIPORE. L'exposició de les membranes va ser de 5 minuts.

7.4.1. Quantificació:

Es va emprar el programa ImageLabTM Software, que és un programa de la companyia Bio-Rad, per l'adquisició d'imatges i la quantificació de les bandes.

7.5. Anàlisi estadístic:

Per avaluar diferències entre els dos grups de ratolins, condicionats i shams, es van realitzar les mitjanes dels resultats obtinguts en cada ratolí (n=3), i per veure si les diferències obtingudes eren estadísticament significatives. Es va realitzar un test "t Student" prenent com a significatiu valor de $p < 0,05$, amb el software Graphpad Calculator (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>). Els valors de les quantificacions estan representats amb la mitjana \pm la desviació estàndard (*Standard Deviation*, SD).

8. Resultats:

Partint dels vuit FTs obtinguts amb els programes bioinformàtics, es van seleccionar cinc FTs com a possibles candidats de la regulació dels gens implicats en la neuroprotecció, els altres tres es van descartar perquè ja havien estat descrits en el fenomen de TI. Prèviament, es van validar els anticossos dels FTs, per tal de veure la seva expressió en còrtex de ratolí adult en cervells controls.

8.1.Expressió nuclear dels FTs després del condicionament isquèmic:

Totes les immunofluorescències van ser realitzades en 8 talls coronals de cervell de ratolí al llarg de l'eix rostro-caudal, on el gruix de cada tall va ser de 16 µm. La quantificació dels FTs en el model murí de preconditionament es va realitzar "a cegues" i per duplicat. És a dir, la presa d'imatges com la quantificació d'aquestes les van realitzar, de manera independent, dos persones que desconeixien si les mostres eren de ratolins condicionats o shams. Les següents imatges mostrades en aquest treball corresponen, majoritàriament, a la regió somatosensorial del còrtex, ja que és en aquesta on es van observar més diferències.

- **NFKβ- P65:**

L'expressió i localització del FT NFKβ-P65 es va analitzar amb el microscopi de fluorescència, ja que la senyal a 10 augments era suficientment intensa com per estudiar-ne la distribució. Es va veure que es troba dins els nuclis tant en cervells condicionats com en cervells shams (Figura 5A-B), però més intens en els cervells condicionats. NFKβ-P65 ja havia estat implicat en el preconditionament isquèmic, per tant, ens va servir com a control positiu per validar el condicionament, però no vàrem fer-ne cap tipus de quantificació.

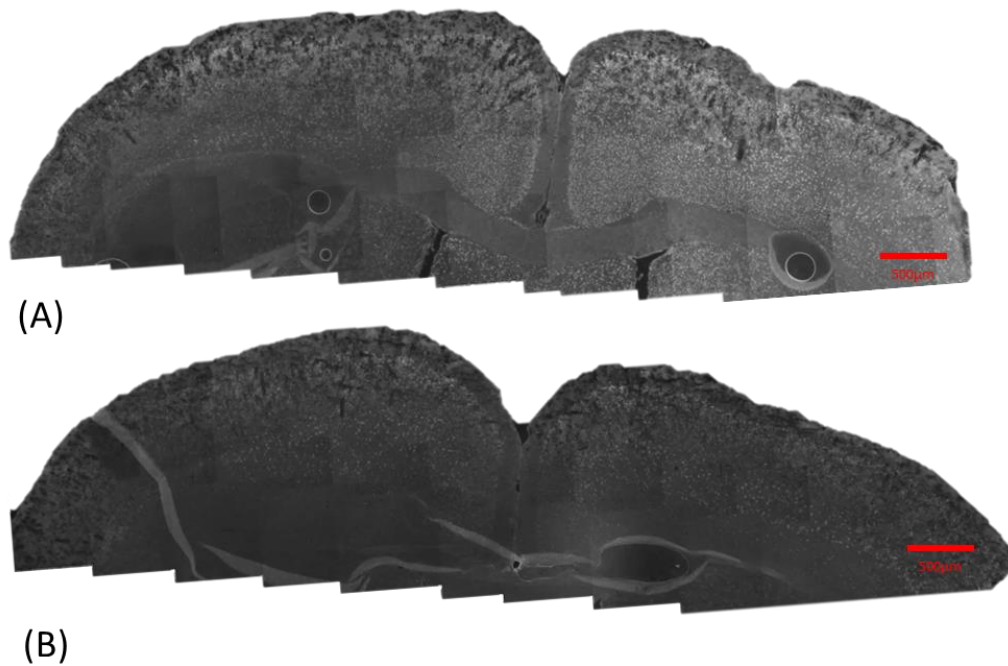


Figura 5. Les imatges A (cervell condicionat) i B (cervell sham) corresponen a una immunofluorescència amb NFK β -P65 (blanc). Les imatges es van realitzar al microscopi de Fluorescència, a 10x (temps d'exposició 3,1 segons). Les dues imatges són una composició d'entre 60 i 100 imatges, les quals es van muntar amb el programa *Power Point*.

- **Tbx5:**

Tbx5, es va observar al citoplasma amb un patró puntejat lineal o al voltant dels nuclis en les regions corticals properes al cos callós, en les capes més superficials es va mostrar nuclear sense diferències aparents entre els ratolins condicionats i els shams. Una observació més detallada dels patrons puntejats i la posterior quantificació ens va permetre distingir dos tipus de morfologies característiques en els cervells dels ratolins condicionats. En la primera imatge (Figura 6A) s'observa una morfologia del FT en forma de punts continus o “cadenetes”, la qual no és tant abundant si es compara amb la segona imatge (Figura 6B), en aquests patrons Tbx5 es disposava al voltant del nucli. En canvi, la imatge de sota (Figura 6C) destaca per una morfologia filamentosa del FT, aquests “filaments” no es relacionaven amb els nuclis neuronals.

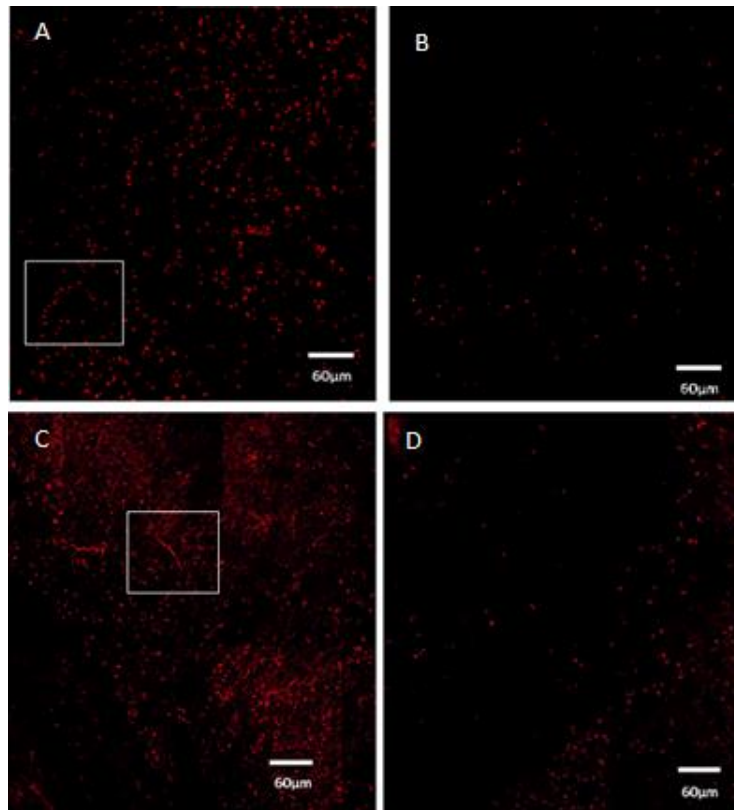


Figura 6. Les imatges A,B,C, i D corresponen a una immunofluorescència amb Tbx5 (marcat en vermell). Les diferents imatges corresponen: (A) Tall d'un cervell condicionat, amb morfologia en forma de punts continus (remarcada amb un quadre). (B) Tall d'un cervell sham, on no es veu pràcticament cap morfologia en forma de punts continus. (C) Tall d'un cervell condicionat, amb morfologia filamentosa (remarcada amb un quadre). (D) Tall d'un cervell sham, sense morfologia filamentosa. Totes les imatges van ser preses al microscopi confocal FV1000, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el muntatge de 6 imatges amb un apilat XYZ (de 21 *slices* de 1 µm/slice cada una).

A continuació s'ensenya l'anàlisi estadístic de la quantificació dels punts continus (cadenetes) i filaments de Tbx5 dels diferents talls dels cervells condicionats (n=3) i dels cervells shams (n=3), a partir de les imatges obtingudes al microscopi confocal (Taula 1 i Taula 2):

Taula 1. Taula de les quantificacions de les cadenes de punts continus. La mitjana i la desviació (DESV) es va realitzar respecte als nuclis totals.

	HEMISFERI CONTRALATERAL			HEMISFERI INTERVINGUT		
	MITJANA	DESV	P-valor	MITJANA	DESV	P-valor
Tall 1 COND	3,01%	0,77%	0,0135	2,67%	1,70%	0,1977
Tall 1 SHAM	0,00%	0,00%		0,42%	0,28%	
Tall 2 COND	1,98%	0,43%	0,0112	2,17%	0,27%	0,0094
Tall 2 SHAM	0,35%	0,50%		0,06%	0,09%	

Taula 2. Taula de les quantificacions de la morfologia filamentosa.

	HEMISFERI CONTRALATERAL		HEMISFERI INTERVINGUT	
	MITJANA	DESV	MITJANA	DESV
Tall 1 COND	0,82%	0,97%	0,28%	0,49%
Tall 1 SHAM	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Tall 2 COND	1,00%	1,11%	0,13%	0,22%
Tall 2 SHAM	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

L'anàlisi estadístic de les cadenes de punts continus (cadenetes) va mostrar diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) en els talls 1 i 2 de l'hemisferi contra lateral del cervell condicionat i en el tall 2 de l'hemisferi intervingut. En canvi, la morfologia filamentosa va destacar per l'absència d'aquesta en els cervells shams.

La morfologia "filamentosa" mostra un patró que sembla seguir les dendrites neuronals, i a més es veu augmentat en els cervells condicionats (Figura 7A-B), cosa que va fer pensar que Tbx5 podria estar situat en les sinapsis neuronals. Malauradament els anticossos de Sinaptofisina i proteïna de Vesícula Sinàptica de Tipus-2 (SV-2) emprats en la immunofluorescència per colocalitzar Tbx5 amb proteïnes sinàptiques, no van funcionar, per lo que no es pot assegurar ni descartar la presència de Tbx5 en sinapsis (Figura 7C).

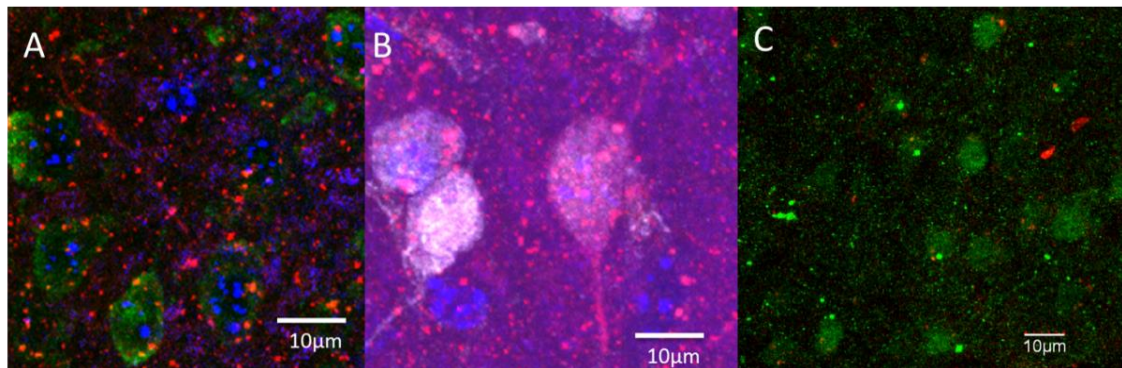


Figura 7A-B. Immunofluorescència de Tbx5 (marcat en vermell), DAPI (blau) i NeuN, marcador de neurones (blanc en la imatge A i verd en la imatge B). Imatges realitzades al microscopi confocal *FV1000*, a 60x amb oli d'immersió amb zoom digital (Entre 2,5x i 1,2x). El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 18 slices de 0,5 µm/slice). **Figura 7C.** La imatge correspon a una immunofluorescència amb SV-2 (vermell) i Tbx5 (verd). Imatge realitzada al microscopi confocal *FV1000*, a 60x amb oli d'immersió amb zoom. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 32 slices de 0,5 µm/slice).

- **Znf384:**

Les immunofluorescències de Znf384, no van mostrar diferències en quant a la seva localització cel·lular, ja que tant en els cervells condicionats com en els cervells shams, es va trobar nuclear en les neurones de la regió propera al cos callós (Figura 8).

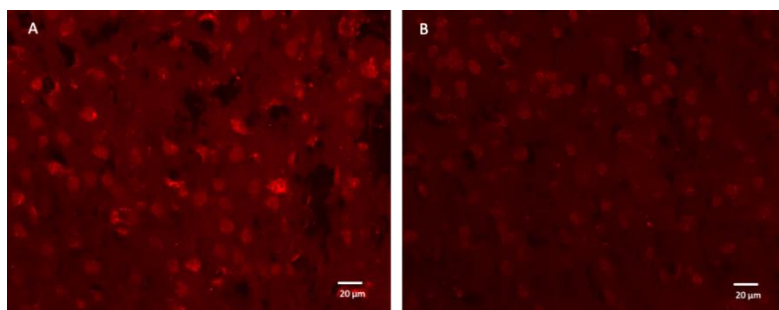


Figura 8. La imatge A correspon a un cervell condicionat i la imatge B a un cervell sham. Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilatz XYZ (de 21 slices de 1µm/slice).

A continuació es mostra l'anàlisi estadístic de les quantificacions realitzades (Figura 9), on es destaca un augment de l'expressió nuclear en els Talls 1 i 2 dels cervells shams, però en canvi augmenta en els Talls 3 i 4 dels cervells condicionats. Per tant, donat que la desviació estàndard és elevada, no s'han obtingut diferències significatives en quant a la localització nuclear. S'esperava obtenir un augment de l'expressió nuclear de Znf384 en tots els talls del cervells condicionats.

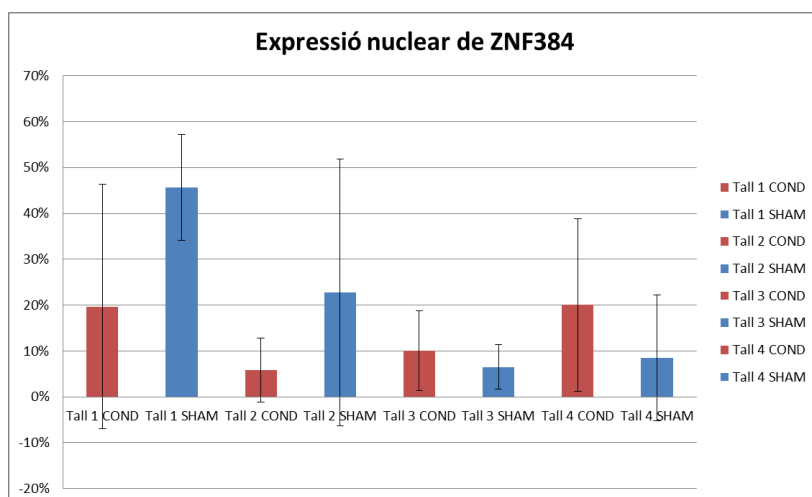


Figura 9. Anàlisi estadístic de la quantificació nuclear del FT Znf384 en els diferents talls de cervells dels dos grups. Es va realitzar un t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), on no es van obtenir diferències significatives ($p > 0.05$ en totes les comparatives). Les mitjanes i desviacions estàndards són les següents: Tall1 condicionat $19,69 \pm 26,64$; Tall1 sham $45,62 \pm 11,57$; Tall2 condicionat $5,83 \pm 7,01$; Tall2 sham $22,75 \pm 29,07$; Tall3 condicionat $10,00 \pm 8,72$; Tall3 sham $6,51 \pm 4,88$; Tall4 condicionat $20,06 \pm 18,80$; i Tall4 sham $8,51 \pm 13,77$.

- **Znf238:**

En referència al FT Znf238, no es van veure diferències significatives (Figura 10) en quant a la localització cel·lular, ja que tant en els cervells condicionats com en els cervells shams, el FT es va trobar nuclear en la regió propera al cos callós.

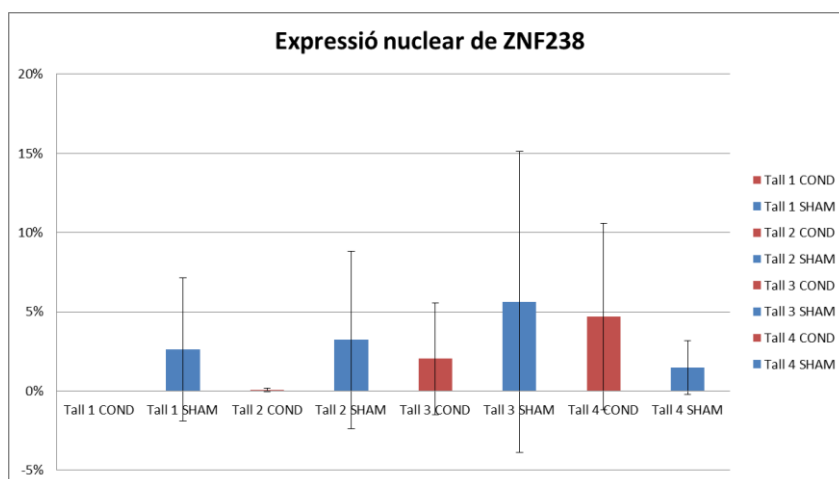


Figura 10. Anàlisi estadístic de la quantificació nuclear del FT Znf238 en els diferents talls de cervells dels dos grups (n=3 per cada grup). Es va realitzar un t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), on no es van obtenir diferències significatives. Les mitjanes i desviacions estàndards són les següents: Tall1 condicionat 0 ± 0 ; Tall1 sham $2,607 \pm 4,516$; Tall2 condicionat $0,058 \pm 0,101$; Tall2 sham $3,221 \pm 5,579$; Tall3 condicionat $2,034 \pm 3,524$; Tall3 sham $5,629 \pm 9,500$; Tall4 condicionat $4,696 \pm 5,886$; i Tall4 sham $1,479 \pm 1,692$.

Però si es van veure diferències rellevants en quant a la morfologia del FT. En les capes I-IV del còrtex cerebral de l'hemisferi intervingut dels cervells condicionats es va observar un patró de línies contínues (Figura 11 i Figura 12).

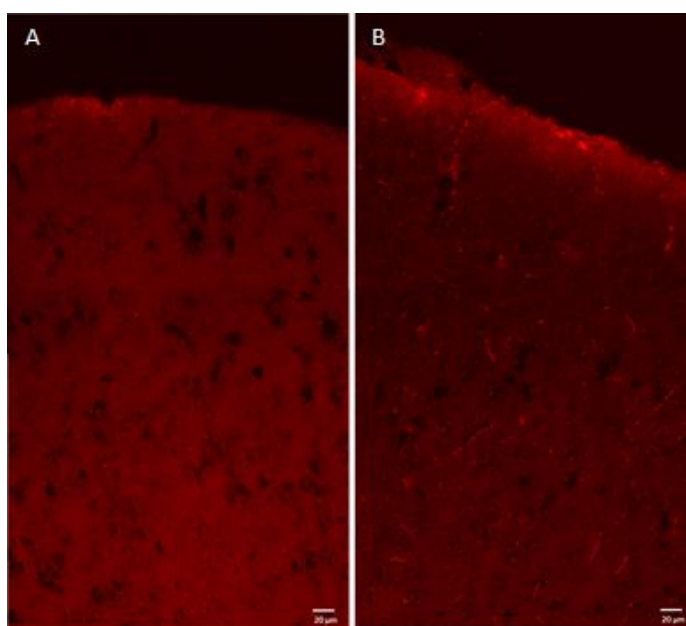


Figura 11. Les dues imatges estan fetes a partir d'una immunofluorescència amb Znf238 (vermell). La imatge A correspon a un cervell sham i la B a un cervell condicionat. Imatges realitzades al microscopi confocal *FV1000*, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el muntatge de 2 imatges amb un apilament XYZ (21 slices de 1µm/slice cada una).

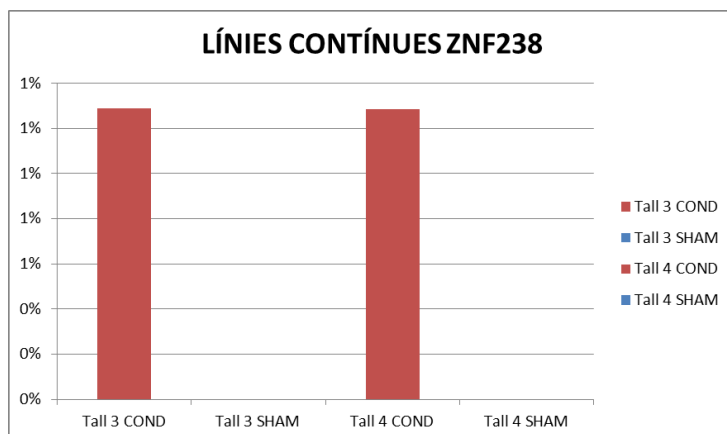


Figura 12. Quantificació de línies contínues del FT Znf238 en els diferents talls de cervells dels dos grups (n=3 per cada grup).

- **DMO:**

D'igual manera, en el FT DMO, no es van trobar diferències importants en quant a la localització cel·lular, ja que tant en el cervell condicionat com en el sham presenta una disposició nuclear. No obstant, a l'hora de quantificar els nuclis de DMO, a partir de les imatges de les immunofluorescències (Figura 13D-E), es van poder diferenciar diferents intensitats: nuclis de DMO forts i nuclis de DMO fluixos.

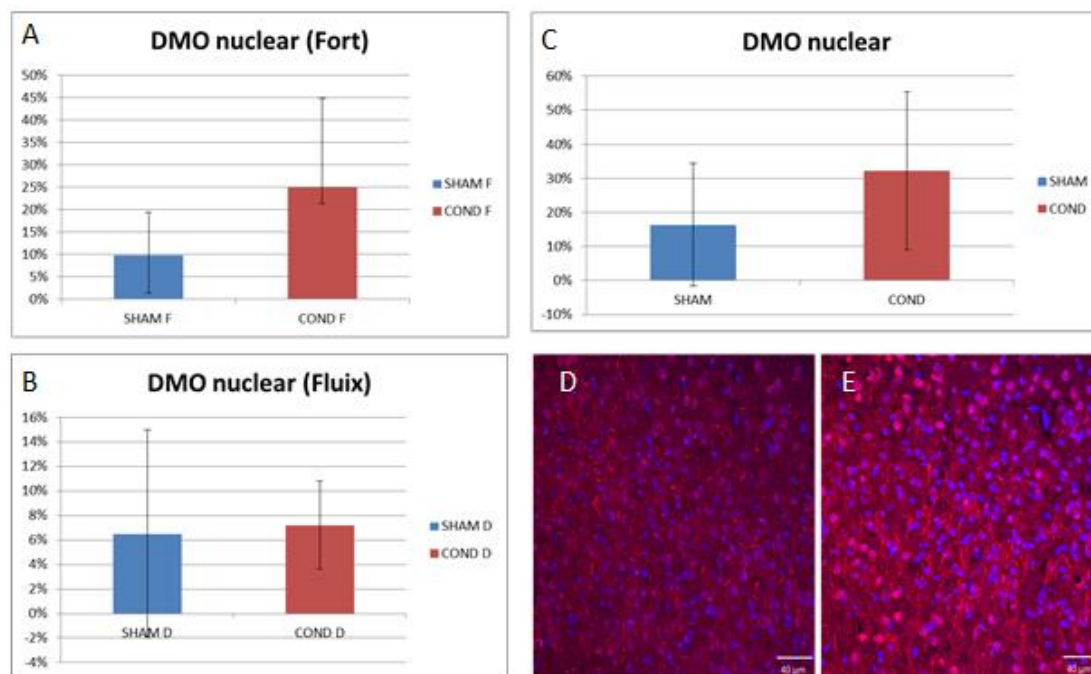


Figura 13. Les imatges A,B, i C són gràfics de quantificació de nuclis de DMO segons les diferents intensitats entre els grups shams i condicionats (n=3 per cada grup). Les mitjanes i desviacions estàndards són: ShamF $9,88 \pm 9,44$; CondF $24,96 \pm 19,86$; ShamD $6,50 \pm 8,49$; CondD $7,22 \pm 3,60$; Sham $16,38 \pm 17,93$; i Cond $32,18 \pm 23,11$. Les imatges D (cervell sham) i E (cervell condicionat) són immunofluorescències de DMO (vermell) i DAPI (blau). Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 21 slices de $1\mu\text{m/slice}$).

Els següents gràfics (Figura 13A-C) no presenten diferències significatives entre els grups shams i els grups condicionats, però mostren un increment en els cervells condicionats. Per tal de validar les quantificacions realitzades a partir de les immunofluorescències, es va dur a terme un Western Blot (Figura 14), per veure els nivells d'expressió de DMO en dues regions del còrtex (còrtex superficial i còrtex profund).

Com a control de càrrega es va utilitzar el Blau de Coomassie (es va tenyir la membrana amb Blau de Coomassie). Es van observar els nivells d'intensitat de varies bandes que tinguessin igual resposta. Llavors, es va triar com a banda de referència aquella que no estès saturada en cap carril però que estigués present a tots, de manera que permetés distingir diferents intensitats entre bandes.

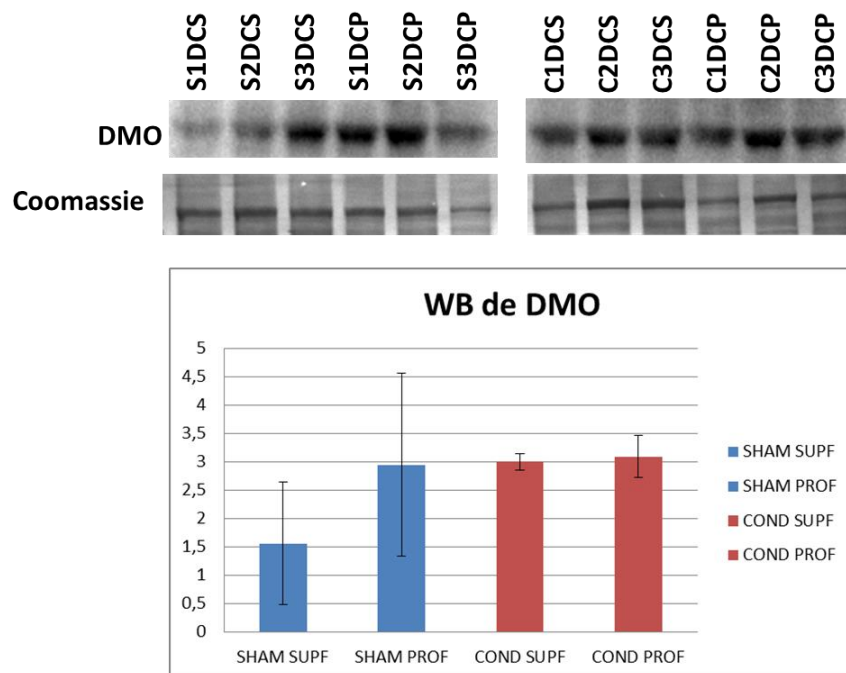


Figura 14. Western Blot de mostres de teixit cerebral del costat on s'ha realitzat la cirurgia, separades en dues regions, còrtex superficial i còrtex profund. Els nivells de DMO s'han normalitzat respecte al control de càrrega, Coomassie. L'anàlisi estadístic del Western Blot, t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), dona un p-valor de 0,0824 (no és estadísticament significatiu) en còrtex superficial. Les diferents mostres (n=3) presenten una mitja i una desviació estàndard: Sham còrtex superficial $1,56 \pm 1,07$. Sham còrtex profund $2,95 \pm 1,61$. Condicionat còrtex superficial $3,01 \pm 0,14$. Condicionat còrtex profund $3,09 \pm 0,37$.

D'aquesta manera, els resultats del Western Blot van presentar un augment dels nivells de proteïna DMO en el còrtex superficial dels cervells condicionats respecte als shams. En canvi, en el còrtex profund els nivells de DMO no van augmentar, sinó que es van mantenir de manera similar en el cervell condicionat respecte al sham. Per tant, tot i no

ser resultats estadísticament significatius, van presentar una tendència a augmentar el DMO en les capes superficials del còrtex condicionat.

D'igual manera que en Znf238, es van veure diferències importants en DMO, en quant a la morfologia en forma de línies contínues, en el còrtex cerebral dels condicionats de l'hemisferi intervingut. Aquestes línies contínues es van visualitzar entre les capes I-IV del còrtex cerebral (Figura 15 i Figura 16).

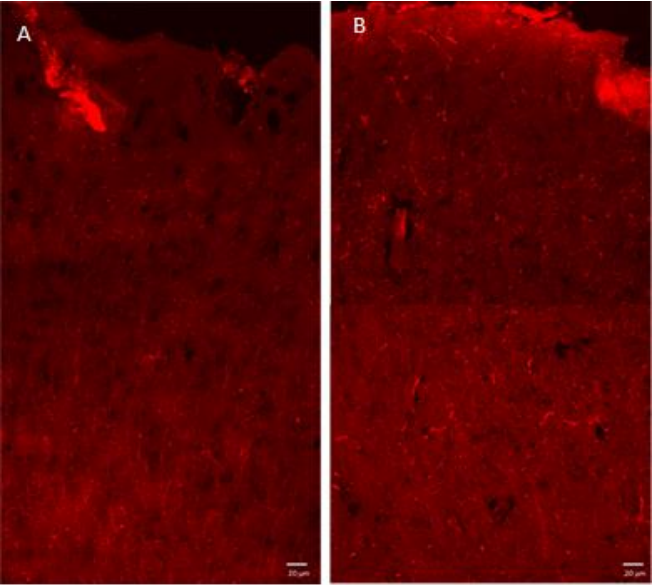


Figura 15. Les dues imatges estan fetes a partir d'una immunofluorescència amb DMO (vermell). La imatge A correspon a un cervell sham i la B a un cervell condicionat. Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el muntatge de 2 imatges amb un apilatzament XYZ (21 slices de 1µm/slice cada una).

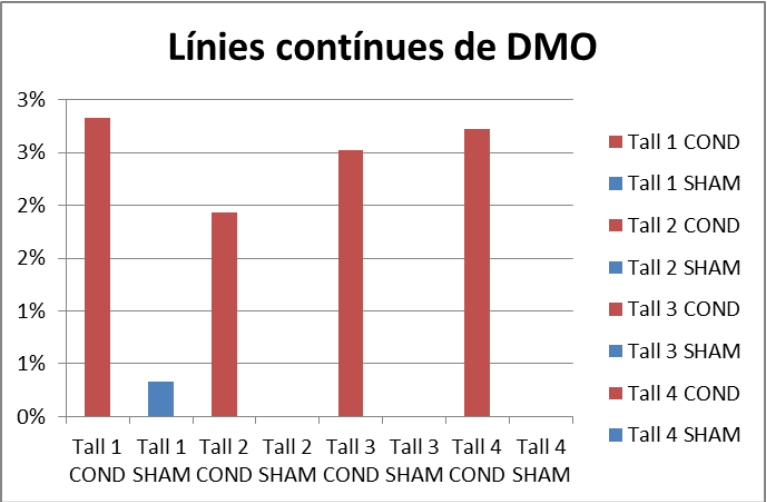


Figura 16. Quantificació de línies contínues del FT DMO en els diferents talls de cervells dels dos grups (n=3 per cada grup).

8.2. Possible “rol en la vasodilatació” degut a l’expressió dels FTs en vasos:

La morfologia descrita en forma de línies contínues pels FTs Znf238 i DMO que només s’ha observat en cervells condicionats, ens va fer plantejar la hipòtesi de que podria correspondre a marcar vasos cerebrals.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, es va dur a terme una immunofluorescència amb un marcador de vasos com és α -actina de múscul llis (α SMA). Aquesta proteïna s’expressa sobretot en les cèl·lules situades més a prop de l’extrem arteriolar dels capil·lars, que participa en la contracció dels vasos sanguinis (Figura 17).

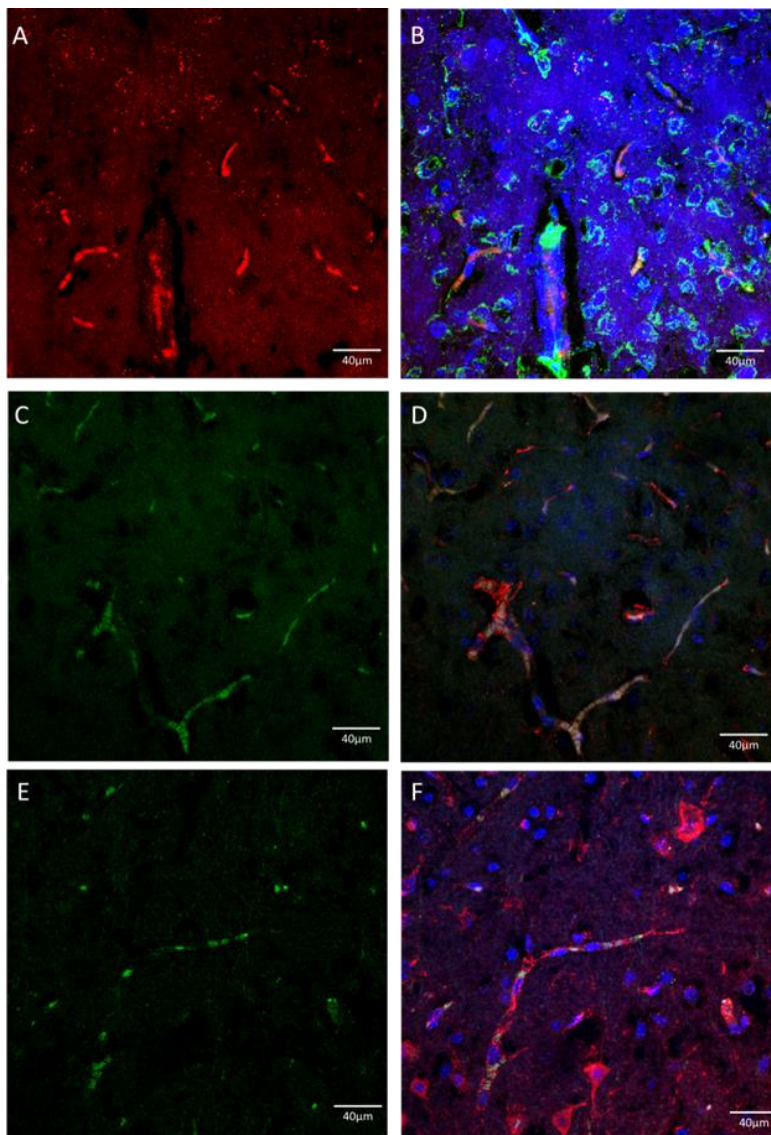


Figura 17. Imatge (A-B) realitzades a partir d’immunofluorescències de Znf238 (vermell), DAPI (blau) i α SMA (verd). Imatges (C-F) de DMO (verd), DAPI (blau) i α SMA (vermell). Imatges obtingudes a 60x amb oli d’immersió en el microscopi confocal *FV1000*. El resultat de cada imatge és el conjunt d’un apilat XYZ (de 29 slices de 0,5µm/slice) dels cervells condicionats.

Els resultats van mostrar una colocalització del marcador α SMA amb els FTs (DMO i Znf238). Així doncs, es pot dir que els FTs estudiats s'expressen de manera específica després d'un condicionament en els vasos sanguinis que irriguen el cervell. No obstant, es va plantejar la possibilitat de buscar altres marcadors de vasos descrits en cervell de ratolí, ja que α SMA a part de marcar els vasos sanguinis, també marca neurones, i el marcatge de vasos no és del tot uniforme, de manera que dificulta fer-ne un estudi morfològic complet.

Per tant, es va utilitzar Glut-1 com a marcador alternatiu de microvasos en cervell de ratolí, tant per demostrar la localització vascular de DMO i de Znf238, com per poder mesurar el diàmetre dels vasos i/o microvasos (marcats amb Glut-1) en els cervells condicionats respecte als shams. D'aquesta manera també es pot determinar si existeix vasodilatació (Figura 18 i Figura 19). Les imatges van mostrar una colocalització de DMO i Znf238 amb Glut-1, demostrant, un cop més, la presència de DMO i Znf238 en la vasculatura cerebral dels cervells condicionats.

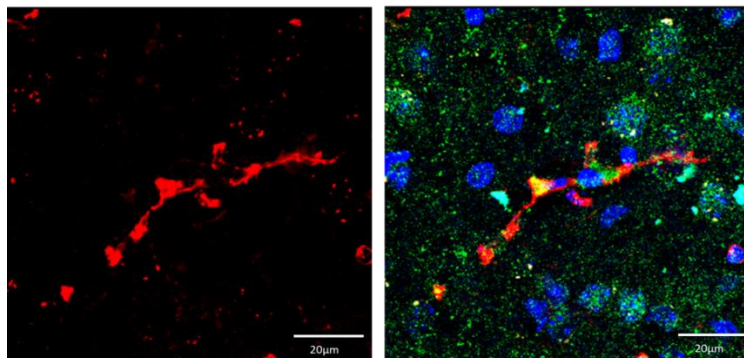


Figura 18. Les imatges corresponen a una immunofluorescència amb DMO (verd), DAPI (blau) i Glut-1 (vermell). Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 60x amb oli d'immersió amb zoom. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 39 slices de 0,5 µm/slice).

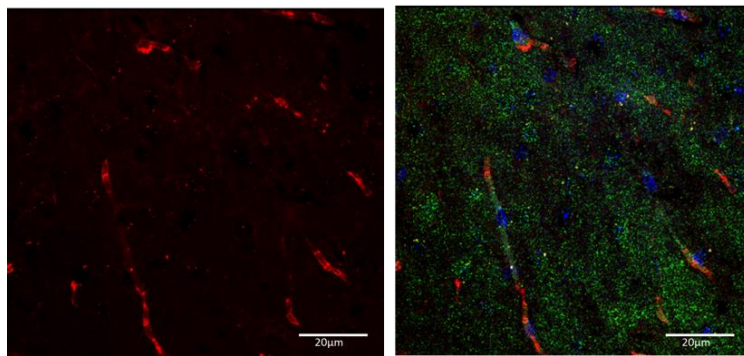


Figura 19. Les imatges corresponen a una immunofluorescència amb Znf238 (verd), DAPI (blau) i Glut-1 (vermell). Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 60x amb oli d'immersió amb zoom. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 39 slices de 0,5 µm/slice).

Mitjançant el microscopi de fluorescència *Olympus BMX51/52* es va realitzar un mapeig dels talls de cervell de la immunofluorescència amb Glut-1, per tal de veure si hi ha més vasos sanguinis en els cervells condicionats versus els cervells shams (Figura 20).

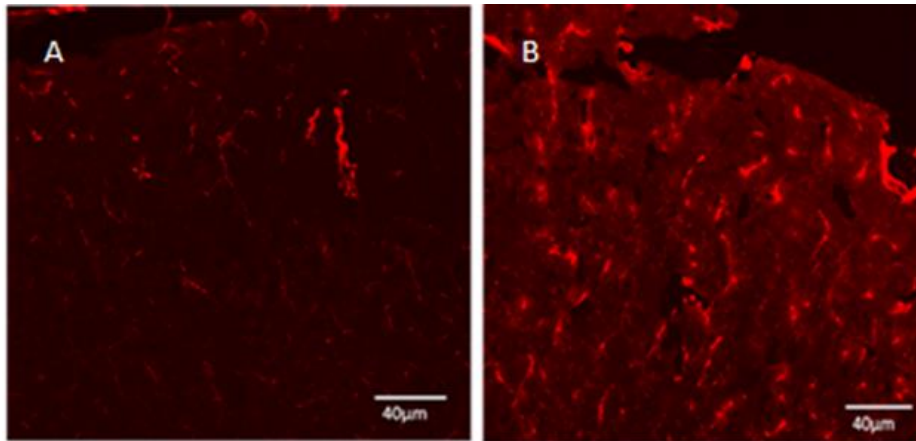


Figura 20. Les imatges A (cervell sham) i B (cervell condicionat) corresponen a una immunofluorescència amb Glut-1 (vermell). Imatges realitzades al microscopi confocal *FV1000*, a 40x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilat XYZ (de 15 slices de 2µm/slice).

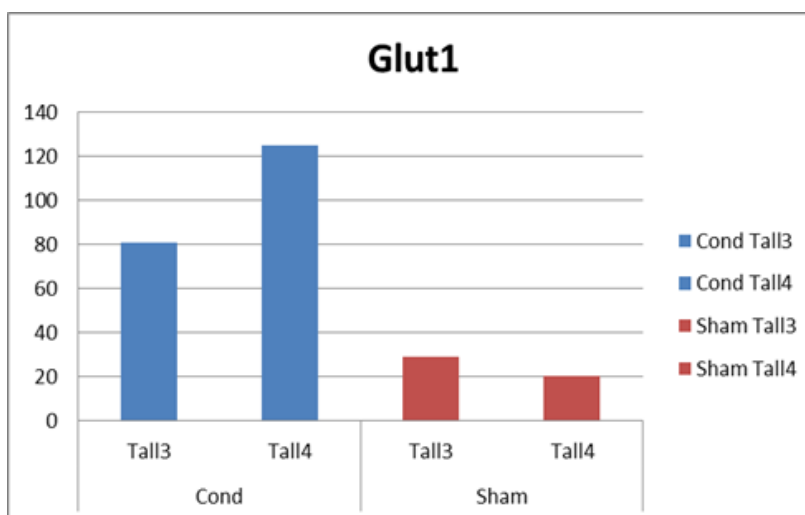


Figura 21. Quantificació de vasos marcats amb Glut-1 en els diferents talls de cervells dels dos grups.

Els resultats van mostrar un increment del nombre de vasos visibles en els cervells condicionats respecte els shams (Figura 21). Aquesta mateixa quantificació també es va realitzar amb les imatges de la immunofluorescència amb Znf238, i el resultat va ser el mateix.

D'altra banda, per tal de comprovar millor el possible fenomen de vasodilatació induït pel condicionament isquèmic, es van prendre imatges confocals d'alta resolució de les immunofluorescències de Glut-1, i es va comparar el diàmetre de cada microvas d'una regió cortical concreta tant en el cervell condicionat com en el sham (Figura 22 i Figura

23). Els resultats de la següent quantificació van mostrar un augment del 23% aproximadament, del diàmetre dels vasos cerebrals dels cervells condicionats respecte als shams.

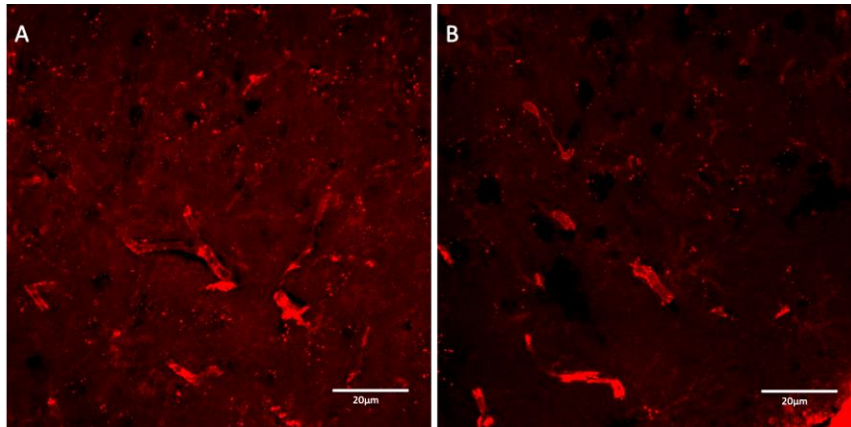


Figura 22. Les imatges A i B corresponen a una immunofluorescència amb Glut-1 (vermell). Imatges realitzades al microscopi confocal FV1000, a 60x amb oli d'immersió. El resultat de cada imatge és el conjunt d'un apilatzament XYZ (de 39 slices de 0,5 µm/slice).

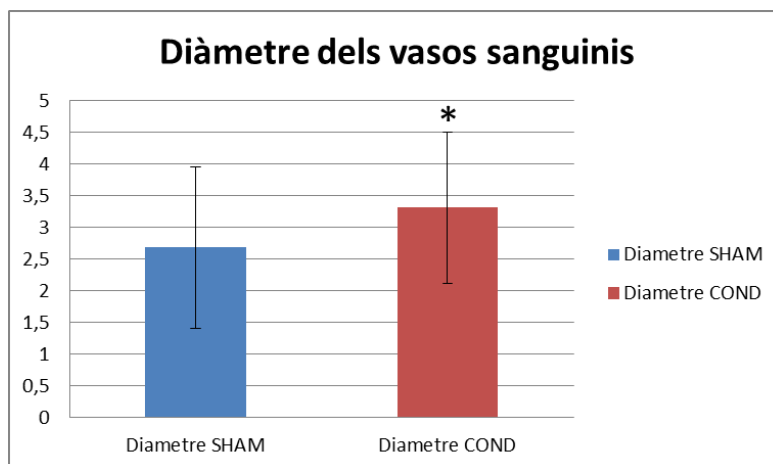


Figura 23. Gràfic de la quantificació del diàmetre dels vasos en una regió del còrtex (n=44 vasos per grup). L'anàlisi estadístic, t-test, (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), dona un p-valor de 0,015 (estadísticament significatiu). Les mitjanes i desviacions estàndards són: Sham 2,683 ± 1,277; i Cond 3,313 ± 1,193.

A partir d'aquests resultats, no es va poder dir si aquest augment en el nombre de vasos és degut a un augment dels nivells de Glut-1 (transportador de glucosa), o bé, perquè es produeix una vasodilatació dels vasos sanguinis i és per aquest motiu que són més visibles en els cervells condicionats, o és el resultat de la combinació d'ambdues possibilitats.

Per tal de respondre aquestes hipòtesis, es va dur a terme un Western Blot de Glut-1 (Figura 24) i un altre de Desmina que és un marcador de perícits (Figura 25), a partir de les meninges del cervell del ratolí (regió del cervell més irrigada per vasos), per veure

l'expressió de proteïna en els dos grups (condicionats i shams). D'aquesta manera es va poder quantificar directament si hi ha un increment en el nombre de vasos (nivells marcador vascular), si hi ha un increment global de la captació de glucosa en el cervell condicionat (nivells de Glut-1) i si els vasos presenten més quantitat de Glut-1 (*ratio* Glut-1/marcador vascular).

El Western Blot va mostrar un increment en els nivells de Glut-1 en les meninges dels shams, però degut a l'elevada variabilitat entre mostres la desviació estàndard és molt elevada.

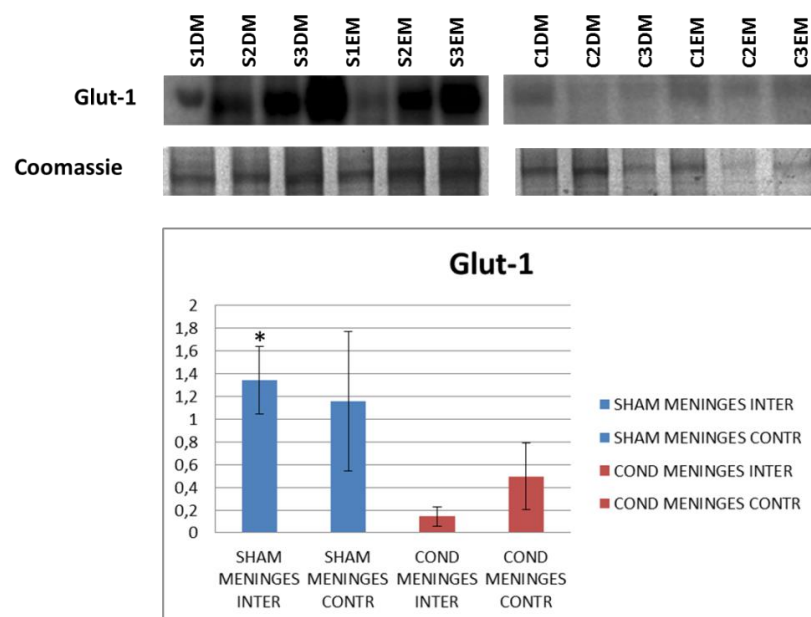


Figura 24. Western Blot de les meninges presents en el teixit cerebral. Com a control de càrrega, Blau de Coomassie. L'anàlisi estadístic del Western Blot, t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), dona un p-valor de 0,0023 en l'hemisferi intervingut i un p-valor de 0.1699 en l'hemisferi contralateral. Les diferents mostres (n=3) presenten una mitja i una desviació estàndard: Sham Inter $1,340 \pm 0,296$; ShamContr $1,154 \pm 0,614$; Cond Inter $0,142 \pm 0,142$; Cond Contr $0,497 \pm 0,294$.

No obstant, no es pot dir que hi ha més Glut-1 en els shams, perquè en el Western Blot de Desmina aquests també estan incrementats, la qual cosa, voldria dir que en els cervells sham es va agafar més tros de teixit vascular. Per tant, aquests valors es van corregir respecte al nivell de Desmina, per fer la proporció i veure si realment hi ha més Glut-1.

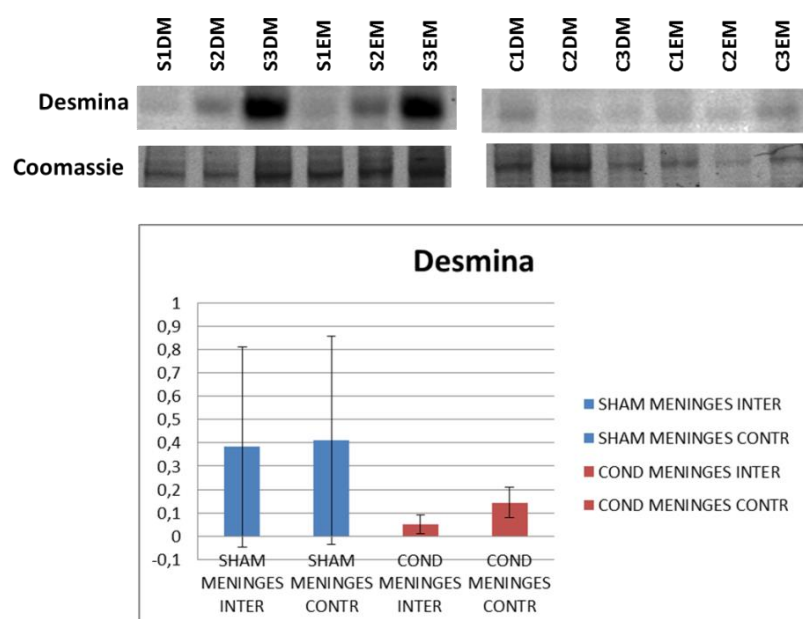


Figura 25. Western Blot de les meninges presents en el teixit cerebral. Com a control de càrrega, Blau de Coomassie. L'anàlisi estadístic del Western Blot, t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), dóna un p-valor de 0,2517 en l'hemisferi intervingut i un p-valor de 0,3621 en l'hemisferi contralateral. Les diferents mostres (n=3) presenten una mitja i una desviació estàndard: Sham Inter $0,383 \pm 0,429$; Sham Contr $0,411 \pm 0,447$; Cond Inter $0,050 \pm 0,040$; Cond Contr $0,143 \pm 0,064$.

Els resultats, corregint els nivells d'expressió respecte a Desmina, mostren una proporció similar (Figura 26). De manera que es pot dir, que tot i que la TI indueix una vasodilatació, la proporció de receptors Glut-1 per superfície de vas es manté igual tant en ratolins condicionats com en shams.

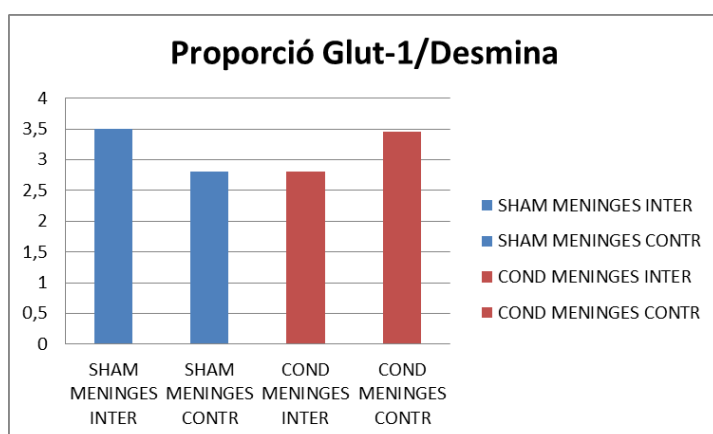


Figura 26. Proporció (*Ratio*) del Western Blot amb Glut-1 respecte el Western Blot amb Desmina.

Finalment, es va proposar fer passar la membrana de DMO per GAPDH, ja que en estudis anteriors, s'ha descrit com una proteïna que es veu alterada en condicions isquèmiques (Figura 27). El GAPDH (Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa) és un enzim que serveix per descompondre la glucosa en energia i carboni, i per tant, es troba

implicat en el metabolisme de la glucosa. Els resultats del present Western Blot van mostrar un increment de GAPDH en els cervells condicionats en les mostres de còrtex superficial. Encara que no hi hagueren diferències significatives (n=3 Shams i n=3 Condicionats) aquests resultats van mostrar una tendència.

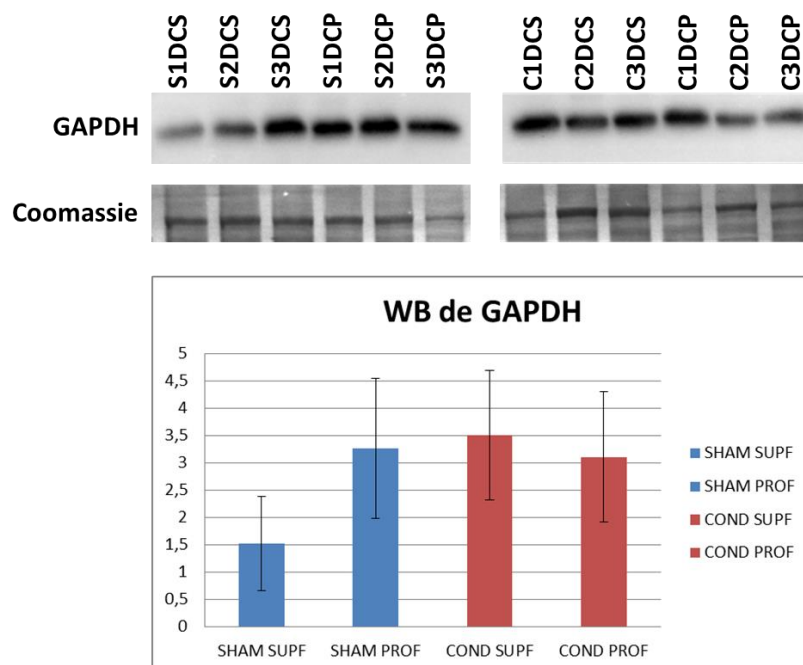


Figura 27. Western Blot de mostres de teixit cerebral del costat on s'ha realitzat la cirurgia, separades en dues regions, còrtex superficial i còrtex profund. Els nivells de GAPDH, s'han normalitzat respecte al control de càrrega, Coomassie. L'anàlisi estadístic del Western Blot, t-test (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>), dóna un p-valor de 0,0772 (no és estadísticament significatiu). Les diferents mostres (n=3) presenten una mitja i una desviació estàndard: Sham còrtex superficial $1,52 \pm 0,86$. Sham còrtex profund $3,27 \pm 1,28$. Condicionat còrtex superficial $3,51 \pm 1,18$. Condicionat còrtex profund $3,11 \pm 1,19$.

8.3. Resum dels resultats:

Taula 3. Taula resum dels resultats obtinguts en aquest treball.

	Condicionat	Sham
NFKβ-P65	Nuclear, més intens	Nuclear, menys intens
Tbx5	Presència de cadenes de punts continus (cadenetes) i filaments.	A penes presència de cadenes de punts continus (cadenetes) i filaments.
Znf384	Nuclear.	Nuclear.
Znf238	Nuclear. S'expressa en vasos sanguinis.	Nuclear. No s'expressa en vasos sanguinis.
DMO	Nuclear, més nivells. S'expressa en vasos sanguinis.	Nuclear, menys nivells. No s'expressa en vasos sanguinis.
Glut-1	Més per IF. WB igual per superfície de vas.	Menys per IF. WB igual per superfície de vas.
GAPDH	Tendència en augment.	No tendència.
Vasodilatació	Augment d'un 10-15%.	No augment.
Vasos cerebrals visibles	Increment.	No increment.

9. Discussió:

Dels vuit FTs obtinguts mitjançant eines bioinformàtiques (*Transfact* i *IPA*), se'n han comprovat cinc en ratolins adults sotmesos a condicionament isquèmic, emprant les tècniques d'immunofluorescència i Western Blot.

- **NFK β -P65 i la seva implicació en el fenomen de TI:**

En l'estudi de Liang et al. va demostrar que la protecció del preconditionament isquèmic, causada per un atac isquèmic transitori, està associada a l'atenuació de l'activació del FT NFK β -p65 en les neurones (Liang et al. 2014). Cal destacar que en el seu estudi, Liang et al. analitzaven l'activitat de p65 en ratolins preconditionats versus sham un cop patien l'ictus (6 i 24h després de la reperfusió), mentre que en el nostre model es van mirar els nivells 24h després del preconditionament, però sense sotmetre als animals a cap infart cerebral. Així doncs, el nostre model indica que NFK β -p65 pot jugar un paper en el fenomen de TI, ja que es veu més expressat en neurones de ratolins sotmesos a condicionament. Seria interessant observar si, al igual que s'ha descrit, un cop realitzat l'ictus, NFK β -p65 s'inhibeix.

- **Tbx5 i la possible localització en les dendrites neuronals:**

En l'anàlisi mitjançant immunofluorescència la localització de Tbx5 presentava variacions segons la regió del còrtex. Es va veure que principalment es troba perinuclear i en forma filamentosa en la regió pròxima al cos callós, però per sobre, la distribució era diferent i esdevenia nuclear en les neurones més superficials del còrtex.

Com mostren els resultats de la quantificació, aquesta morfologia filamentosa i en forma de punts continus (cadenetes) es troba incrementada de manera significativa en els ratolins condicionats versus els ratolins shams. Aquesta morfologia podria suggerir que Tbx5 es localitza en les dendrites de les neurones de ratolí, i es podria pensar, que participa en la traducció localitzada de mRNA en les espines dendrítiques², de manera similar al FT RAR α , que estimula el creixement dendrític en neurones de l'hipocamp en ratolí. Aquesta expressió intensa de RAR en l'hipocamp "*in vivo*" i en les neurones

²Les espines sinàptiques són petites protuberàncies en la superfície de les dendrites neuronals on es formen els llocs sinàptics per rebre senyals presinàptics i transmetre senyals principalment excitatoris (Fujii & Takumi, 2005).

primàries de l'hipocamp, suggereix una contribució en el control de la traducció, a més de la seva funció establerta com a FT (Chen, Onisko, & Napoli, 2008).

Un altra possibilitat seria que aquesta distribució correspongués a una localització en sinapsis, malauradament, els resultats de la immunofluorescència amb Sinaptofisina i SV-2 no van aportar resultats concrets en quant a la possible implicació en sinapsis. En cas de poder demostrar la presència de Tbx5 en les sinapsis neuronals o en les espines dendrítiques, es complementaria l'estudi dels gens alterats en condicionament realitzat en treballs previs del laboratori, on un anàlisi dels gens alterats abans i al llarg de les 24 hores post-condicionament (mitjançant el programa *Gene Ontology*) va mostrar que els gens implicats en remodelació sinàptica estaven enriquits en la nostra mostra.

Cal destacar que el paper de Tbx5 en el còrtex de ratolí adult no ha estat mai descrit per lo que no es sap amb claredat si podria estar implicat en aquest mecanisme.

- **Znf384 s'expressa en els nuclis neuronals corticals:**

No es varen observar canvis ni en localització ni els nivells d'expressió de Znf384. Tot i que caldria validar els resultats per Western Blot, es podria donar una situació en que el FT ha presentat una variació ràpida, de manera que passades les 24 hores, tot i poder detectar els gens que regula, el FT ja no es troba alterat en ratolí condicionat. Potser seria recomanable agafar mostres de ratolí condicionat abans de les 24 hores, un “*time course*” amb mostres a les 12, 16, i 20 hores podria mostrar canvis en la seva localització i/o nivells.

- **La importància de la vasodilatació:**

Durant la isquèmia cerebral, algunes parts del teixit sobreviuen gràcies a la irrigació de vasos col·laterals. La circulació col·lateral es refereix a la xarxa complementària dels vasos sanguinis que compensen el flux sanguini i els efectes negatius de la isquèmia. L'arteriogènesi (increment del diàmetre dels vasos arterials) porta a l'activació de l'endoteli, la invasió de monòcits, la secreció de factors de creixement i citocines, seguit per la digestió de la matriu i en última instància, la proliferació de cèl·lules musculars llises per al desenvolupament de la conductància de flux col·lateral i la remodelació dels vasos col·laterals, que implica l'alliberament d'òxid nítric i la vasodilatació, que és intuïtiu per desenvolupar teràpies que milloren el flux col·lateral mitjançant la inducció de vasodilatació (Liu et al., 2015).

S'ha demostrat que les cèl·lules del miocardi alliberen metabòlits vasoactius que causen la dilatació coronària espontània i s'ha reivindicat que l'endoteli podria jugar un paper clau en la isquèmia cerebral per la vasodilatació. Anteriorment, s'han fet suggeriments sobre el potencial de membrana de les cèl·lules del múscul llis arterial com un factor clau en la vasodilatació durant l'infart cerebral (Kickenweiz et al., 1993).

Diversos estudis han descrit l'increment de l'expressió del factor de creixement vascular endotelial (VEGF) en els cervells isquèmics després d'un accident cerebrovascular, ja que aquest es troba involucrat en diverses respostes: l'angiogènesi, la permeabilitat vascular, la neurogènesi, la quimiotaxis de les cèl·lules inflamatòries, en la inhibició de l'apoptosi, i el seu efecte neuroprotector en el cervell (Manoonkitiwongsa, Schultz, McCreery, Whitter, & Lyden, 2004).

Per tant, es parla de vasodilatació com a resposta durant l'infart cerebral, però fins la data, no s'ha descrit en preconditionament com a mecanisme de neuroprotecció en front l'ictus. En aquest treball, a les 24 hores després del condicionament, només es pot parlar de vasodilatació, no de vasculogènesi, tot i que si es mires a temps més llargs (5-7 dies) es podria parlar d'angiogènesi per tal d'augmentar la quantitat d'oxigen subministrada al teixit isquèmic (Arenillas et al., 2007; Tongers et al., 2010). No obstant, els resultats obtinguts no són concloents alhora de mostrar un augment del nombre de vasos, sinó un augment del diàmetre dels vasos en els cervells condicionats degut al fenomen de vasodilatació després del condicionament, com a resposta neuroprotectora en front l'ictus.

- **El metabolisme de la glucosa implicat en el condicionament isquèmic:**

Enllaçant els resultats anteriors en quant a la vasodilatació, no només s'ha vist un augment del diàmetre dels vasos sanguinis cerebrals, sinó que l'augment del nombre de vasos quantificats podria ser degut a l'increment global dels nivells de Glut-1 observats per immunofluorescència. A partir del Western Blot de Glut-1 en les meninges (regió més irrigada) es va veure que la proporció de Glut-1/Desmina és manté de forma similar, i per tant, al haver un augment de la superfície del vas (vasodilatació) augmenta el nombre de receptors de Glut-1 totals però mantenint-se la proporció de receptors Glut1 per superfície de vas.

De fet, Glut-1 ja s'ha marcat com un objectiu per al tractament de la isquèmia cerebral, ja que l'expressió alta de Glut-1 pot subministrar més glucosa pel cervell isquèmic, que pot ser una mesura eficaç per reduir la pèrdua neuronal (Zhang et al., 2014). Encara que hi ha molt per aprendre sobre la regulació de les isoformes de Glut en el cervell, alguns estudis relacionen la hipòxia i el factor de transcripció HIF1 α amb increments en els nivells de Glut-1 i Glut-3 en la barrera hematoencefàlica, neurones i cèl·lules glials després de la isquèmia (Espinoza-Rojo et al., 2010).

També relacionat amb el metabolisme de la glucosa, els resultats obtinguts per Western Blot mostren una tendència en augment dels nivells de GAPDH en els cervells condicionats, el qual participa com a enzim en la via glucolítica. En models d'isquèmia i reperfusió l'increment de GAPDH i la seva translocació nuclear s'han relacionat amb una inducció de l'apoptosi neuronal (Tanaka et al., 2002), tot i això cal destacar que en el nostre model no existeix mort neuronal, així doncs, podríem considerar que l'increment de GAPDH es relaciona amb un millor aprofitament de la glucosa aportada pels receptors Glut-1. No obstant, seria interessant realitzar una immunofluorescència per veure la localització de GAPDH en les neurones, i descartar-ne la seva presència nuclear pro-apoptòtica.

Més estudis s'han centrat en el metabolisme de la glucosa en l'accident cerebrovascular en les últimes dècades, però en aquest treball es vol veure l'efecte neuroprotector després del condicionament per tal de preparar al cervell abans de l'ictus. No obstant, els resultats obtinguts en aquest treball, descriuen un l'augment de l'expressió de GAPDH i Glut-1 en els cervells condicionats donat que la manca d'energia a causa de la interrupció del flux sanguini és un important contribuent per patir un ictus.

- **Factors de Transcripció que podrien regular el metabolisme de la glucosa i/o la vasodilatació:**

Com ja s'ha comentat al llarg d'aquest treball, aquests FTs, s'han obtingut mitjançant l'anàlisi massiu de dades a partir de l'anàlisi d'expressió de mRNA a temps basal en mostres de ratolí condicionat. Per tant, es podria pensar que DMO i Znf238, els quals s'han vist expressats en els vasos sanguinis dels cervells condicionats, estan implicats en la regulació del metabolisme de la glucosa en sang i/o en la vasodilatació (ambdós mecanismes descrits en els apartats anteriors), com a resposta neuroprotectora en front l'ictus.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesis, mitjançant l'anàlisi de promotors, es va obtenir la seqüència del promotor de Glut-1 per veure la probabilitat de trobar alguns dels FTs descrits prèviament.

Un cop fet l'anàlisi de les seqüències mitjançant algorismes matemàtics, es va veure que Znf238 presenta dues seqüències en tàndem dins de la seqüència del promotor de Glut-1 i un valor estimat de probabilitat de 0,021; la qual cosa vol dir que en 2Kb en trobaríem 0,042. Es a dir la probabilitat de trobar aquestes dos seqüències de Znf238 a l'atzar en 2Kb seria d'una entre seixanta (sense tenir en compte que en el nostre promotor apareixen en tàndem).

D'altra banda, es parla de vasodilatació però s'hauria de veure la implicació d'aquests FTs en alguna via implicada en vasodilatació (exercint un efecte en la inhibició de la contracció del múscul llis vascular, que resulta en vasodilatació), ja que seria una possible teràpia que intenta preservar les neurones, mentre que al mateix temps augmenta el flux sanguini en el cervell isquèmic, i és, sens dubte, un enfocament que mereix atenció. En els *arrays* d'mRNA fets als mateixos temps en els que s'ha realitzat aquest treball, es va veure que l'mRNA del Nppc estava incrementat un 30% (p-valor 0,0018). Aquest pèptid ha estat relacionat amb fenòmens de vasodilatació (Moyes et al 2014), de manera que la seva sobreexpressió ens podria explicar el fenomen de vasodilatació. D'igual manera que amb Glut-1, es va analitzar la seqüència del promotor Nppc per tal de trobar els llocs dels FTs en aquesta seqüència, i es va veure que Mef2c es troba en tàndem al principi i al final de seqüència amb una probabilitat de trobar-los tots tres d'una entre dos-cents quaranta-tres, per tant ens el podríem creure. En tots dos promotors es varen trobar diversos llocs d'AP-1 que caldria considerar.

Vistos els nostres resultats es podria esbossar un model seqüencial en que el preconditionament isquèmic causa un increment dels nivells de Znf238 i DMO en la vasculatura cerebral. Aquests FTs podrien actuar en dos fronts, d'una banda, causant un increment en els nivells de Nppc, de manera que es tindria un fenomen de vasodilatació. D'altra banda incrementant els nivells de Glut-1 en l'endoteli, cosa que permetria captar més glucosa per les neurones, aquestes estarien més preparades per assimilar-la incrementant l'expressió de GAPDH. Així doncs en el moment d'esdevenir l'ictus la vasodilatació ens permetria retenir més volum de sang i els receptors Glut-1 captar-ne millor la glucosa disponible, permetent una millor supervivència neuronal.

10. Limitacions:

Tot i que el treball pretén descobrir noves dianes per a ser emprades en futures teràpies el model utilitzat és de ratolí, així doncs caldria comprovar en models humans (cultius cel·lulars, mostres de pacients...) els nostres resultats. Al utilitzar-se ratolins sotmesos a tècniques quirúrgiques complexes i llargues, la variabilitat entre els individus tendeix a ser elevada, de manera que alguns resultats es poden perdre. La nostra n és de 6 ratolins per grup (3 per immunofluorescència i 3 per Western Blot), incrementar la n suposaria disposar d'uns resultats més fiables.

11. Conclusions:

- 1) En cervells condicionats, per sobre del cos callós, Tbx5 es localitza amb patrons lineals puntejats, i en les capes més superficials és nuclear en ambdós grups.
- 2) NFK β -p65 presenta una localització nuclear més intensa en els cervells condicionats versus els cervells shams en còrtex de ratolí adult.
- 3) Znf384 es troba nuclear sense mostrar diferències entre els dos grups.
- 4) Znf238 a més de presentar una localització nuclear en ambdós grups, s'expressa en els vasos o microvasos cerebrals en ratolins condicionats.
- 5) DMO mostra una localització nuclear en ambdós grups, però hi ha una tendència a ser més elevat en el còrtex superficial dels cervells condicionats.
- 6) DMO s'expressa en els vasos cerebrals en ratolins condicionats.
- 7) Els cervells condicionats presenten més vasculatura.
- 8) Els vasos dels cervells condicionats presenten un augment del diàmetre respecte als cervells shams.
- 9) Globalment el còrtex condicionat presenta nivells més elevats de Glut-1, però la proporció de Glut-1 per superfície de vas no difereix entre condicionats i shams.
- 10) GAPDH mostra una tendència en augmentar en els cervells condicionats.

12. Bibliografia:

- An, G., Lin, T. N., Liu, J. S., Xue, J. J., He, Y. Y., & Hsu, C. Y. (1993). Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Annals of Neurology*, 33(5), 457–64. <https://doi.org/10.1002/ana.410330508>
- Arenillas, J. F., Sobrino, T., Castillo, J., & Dávalos, A. (2007). The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 9(3), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s11936-007-0014-5>
- Arsava, E. M., Gurer, G., Gursoy-Ozdemir, Y., Karatas, H., & Dalkara, T. (2009). A new model of transient focal cerebral ischemia for inducing selective neuronal necrosis. *Brain Research Bulletin*, 78(4–5), 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.11.005>
- Benakis, C., Vaslin, A., Pasquali, C., & Hirt, L. (2012). Neuroprotection by inhibiting the c-Jun N-terminal kinase pathway after cerebral ischemia occurs independently of interleukin-6 and keratinocyte-derived chemokine (KC/CXCL1) secretion. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 76. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-76>
- Budincevic, H., Bielen, I., & Csiba, L. (2011). Translational challenges of neuroprotection strategy in ischemic stroke. *Translational Neuroscience*, 2(4), 344–350. <https://doi.org/10.2478/s13380-011-0041-2>
- Chalovich, J. M., & Eisenberg, E. (2005). NIH Public Access. *Biophysical Chemistry*, 257(5), 2432–2437. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>. Two-stage
- Chamorro Á., Dirnagl U., Urra X. & Planas A. M. “Neuroprotection in acute stroke : targeting excitotoxicity , oxidative and nitrosative stress , and inflammation” *Lancet Neurol* 2016 Published Online May 11, 2016 4422(16). [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00114-9](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00114-9)
- Chen, N., Onisko, B., & Napoli, J. L. (2008). The nuclear transcription factor RAR?? associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20841–20847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802314200>
- Cho, S., Park, E. M., Kim, Y., Liu, N., Gal, J., Volpe, B. T., & Joh, T. H. (2001). Early c-Fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(5), 550–6. <https://doi.org/10.1097/00004647-200105000-00009>
- Cveti, T. (2016). The role of C-Fos protein , somatostatin and neuropeptide Y in the pathogenesis of ischemic brain injuries based on animal model of cerebral ischemia The Role of C-Fos Protein , Somatostatin and Neuropeptide Y in the Pathogenesis of Ischemic Brain Injurie, 37(September), 847–852.

- Ding, D. (2015). Endovascular Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A New Standard of Care. *J Stroke*, 17(2), 123–126. <https://doi.org/10.5853/jos.2015.17.2.123>
- Dirnagl, U., Becker, K., & Meisel, A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *The Lancet Neurology*, 8(4), 398–412. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70054-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70054-7)
- Doyle, M., & Kiebler, M. A. (2011). Focus Review Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *The EMBO Journal*, 30(17), 3540–3552. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.278>
- Espinoza-Rojas, M., Iturralde-Rodríguez, K. I., Chánez-Cárdenas, M.-E., Ruiz-Tachiquín, M. E., & Aguilera, P. (2010). Glucose transporters regulation on ischemic brain: possible role as therapeutic target. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 10(4), 317–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868355>
- Fujii, R., & Takumi, T. (2005). TLS facilitates transport of mRNA encoding an actin-stabilizing protein to dendritic spines. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5755–5765. <https://doi.org/10.1242/jcs.02692>
- Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(6), 437–448. <https://doi.org/10.1038/nrn1927>
- Ginsberg, M. D. (2009). Current status of neuroprotection for cerebral ischemia synaptic overview. *Stroke*, 40(3 SUPPL. 1), 5–10. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.528877>
- Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., ... Turner, M. B. (2013). Heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*, 127(1). <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31828124ad>
- Heard, K. S., Diguette, M., Heard, A. C., & Carruthers, A. (1998). Physiological Society Symposium: Glucose Transport: a Functional Approach Phosphate Dehydrogenase and Multiphasic Erythrocyte Sugar Transport, (January 1997), 195–202.
- Hirabayashi, S., Ohki, K., Nakabayashi, K., Ichikawa, H., Momozawa, Y., Okamura, K., ... Ogata-kawata, H. (2017). Correspondence :, 102(1). <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.151035>
- Hirai, S., Miwa, A., Ohtaka-Maruyama, C., Kasai, M., Okabe, S., Hata, Y., & Okado, H. (2012). RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex. *The EMBO Journal*, 31(5), 1190–202. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.486>

- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). perspective Stroke research at a crossroad : asking the brain for directions. *Nature Neuroscience*, 14(11), 1363–1368. <https://doi.org/10.1038/nn.2953>
- Johnston, D. C. C., & Hill, M. D. (2004). The patient with transient cerebral ischemia: A golden opportunity for stroke prevention. *Cmaj*, 170(7), 1134–1137. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1021148>
- Kickenweiz, E., Grisold, M., Rotman, B., Eber, B., Furian, C., & Klein, W. (n.d.). Current Views on Mechanisms of Vasodilation in Response to Ischemia and Hypoxia, 22–32.
- Kikkawa, T., Obayashi, T., Takahashi, M., Fukuzaki-Dohi, U., Numayama-Tsuruta, K., & Osumi, N. (2013). Dmrt1 regulates proneural gene expression downstream of Pax6 in the mammalian telencephalon. *Genes to Cells*, 18(8), 636–649. <https://doi.org/10.1111/gtc.12061>
- Kulisz, A., & Simon, H.-G. (2008). An evolutionarily conserved nuclear export signal facilitates cytoplasmic localization of the Tbx5 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 28(5), 1553–64. <https://doi.org/10.1128/MCB.00935-07>
- Liang, J., Luan, Y., Lu, B., Zhang, H., Luo, Y. N., & Ge, P. (2014). Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF-kB/p65 activation. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096734>
- Liu, J., Wang, Y., Akamatsu, Y., Lee, C. C., Anne, R., Lawton, M. T., & Yang, G. (2015). Vascular remodeling after ischemic stroke: mechanism and therapeutic potentials, 115, 138–156. <https://doi.org/10.1016/j.jneurobio.2013.11.004>. Vascular
- Manoonkitiwongsa, P. S., Schultz, R. L., McCreery, D. B., Whitter, E. F., & Lyden, P. D. (2004). Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(6), 693–702. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000126236.54306.21>
- Martínez-Vila, E., Murie Fernández, M., Pagola, I., & Irimia, P. (2011). Actualización: Enfermedades cerebrovasculares. *Medicine.*, 10(72), 10(72):4871-81. Retrieved from <http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/pdf/62/62v10n72a13191296pdf001.pdf>
- Ma, X., Liu, M., Liu, Y., Ma, L., Jiang, Y., & Chen, X. (2016). Ischemic preconditioning protects against ischemic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 11(5), 765. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182703>
- Moncayo, J., de Freitas, G. R., Bogousslavsky, J., Altieri, M., & van Melle, G. (2000). Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology*, 54(11), 2089–2094. <https://doi.org/10.1212/WNL.54.11.2089>

- Moyes, A. J., Khambata, R. S., Villar, I., Bubb, K. J., Baliga, R. S., Lumsden, N. G., ... Hobbs, A. J. (2014). Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 4039–4051. <https://doi.org/10.1172/JCI74281>
- O'Collins, V. E., Macleod, M. R., Donnan, G. A., Horky, L. L., Van Der Worp, B. H., & Howells, D. W. (2006). 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Annals of Neurology*, 59(3), 467–477. <https://doi.org/10.1002/ana.20741>
- Sapolsky, R. M. (2001). Cellular defenses against excitotoxic insults. *Journal of Neurochemistry*, 76(6), 1601–1611. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00203.x>
- Stenzel-Poore, M. P., Stevens, S. L., Xiong, Z., Lessov, N. S., Harrington, C. A., Mori, M., ... Simon, R. P. (2003). Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: Similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet*, 362(9389), 1028–1037. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14412-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14412-1)
- Tanaka, R., Mochizuki, H., Suzuki, A., Katsube, N., Ishitani, R., Mizuno, Y., & Urabe, T. (2002). Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(3), 280–288. <https://doi.org/10.1097/00004647-200203000-00005>
- Tongers, J., Roncalli, J. G., & Losordo, D. W. (2010). Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvascular Research*, 79(3), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.01.012>
- Wang, J., Miao, L., Li, M., Guo, X., Pan, N., & Chen, Y. (2014). Cloning the Dmrt1 and DmrtA2 Genes of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) and their expression in adult, larval, and embryonic stages. *Zoological Research*, 35(2), 1–9. <https://doi.org/10.11813/j.issn.0254-5853.2014.E1.E>
- Wang, R. M., Zhang, Q. G., Li, J., Yang, L. C., Yang, F., & Brann, D. W. (2009). The ERK5-MEF2C transcription factor pathway contributes to anti-apoptotic effect of cerebral ischemia preconditioning in the hippocampal CA1 region of rats. *Brain Research*, 1255, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.011>
- Zhang, S., Zuo, W., Guo, X.-F., He, W.-B., & Chen, N.-H. (2014). Cerebral glucose transporter: the possible therapeutic target for ischemic stroke. *Neurochemistry International*, 70, 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.03.007>
- Zsuga, J., Gesztelyi, R., Juhasz, B., Kemeny-Beke, A., Fekete, I., Csiba, L., & Bereczki, D. (2008). Prior transient ischemic attack is independently associated with lesser in-hospital case fatality in acute stroke. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 62(6), 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2008.01874.x>

13. Annexos:

13.1. Llistat d'anticossos utilitzats per les immunofluorescències:

Anticòs primari	Dilució	Referencia	Casa comercial	Anticòs secundari (1:500)	Casa comercial
Anti-Tbx5 (Rabbit)	1:200	orb254071	Biorbyt	Donkey-anti-rabbit594	Jackson ImmunoResearch
Anti-NeuN (Mouse)	1:1000	orb175931	Biorbyt	Donkey-anti-mouse647	Jackson ImmunoResearch
Anti-Iba1 (Goat)	1:200	orb19198	Biorbyt	Donkey-anti-goat488	Jackson ImmunoResearch
Anti-Znf238 (Rabbit)	1:200	orb313583	Biorbyt	Donkey-anti-rabbit594	Jackson ImmunoResearch
Anti-GFAP (Chicken)	1:1000	orb175827	Biorbyt	Donkey-anti-Chicken488	Jackson ImmunoResearch
Anti-P65 (Rabbit)	1:200	orb214512	Biorbyt	Donkey-anti-rabbit594	Jackson ImmunoResearch
Anti-DMO (Rabbit)	1:200	orb156601	Biorbyt	Donkey-anti-rabbit594	Jackson ImmunoResearch
Anti-Znf384 (Rabbit)	1:200	orb313480	Biorbyt	Donkey-anti-rabbit594	Jackson ImmunoResearch
Anti- α -smooth-actin (Mouse)	1:500	A5228	SIGMA	Donkey-anti-mouse488	Jackson ImmunoResearch
Anti-Synaptophysine (Guinea Pig)	1:500	101004	Synaptic Systems	Donkey-anti-pigCy5	Jackson ImmunoResearch
Anti-Glut1 prediluit (Mouse)	1:2	SPM498	ThermoFisher	Donkey-anti-mouse594	Jackson ImmunoResearch

13.2. Llistat d'anticossos per la tècnica de Western Blot:

Anticòs primari	Dilució	Referencia	Casa comercial	Anticòs secundari (1:10000)	Casa comercial
Anti-DMO (Rabbit)	1:500	orb175931	Biorbyt	Goat-anti-rabbit	Sigma-Aldrich
Anti-Tbr1 (Rat)	1:200	ab31940	Abcam	Goat-anti-rat	Sigma-Aldrich

Anti-Glut1 prediluit (Mouse)	1:50	SPM498	ThermoFisher	Sheep-antimouse	Sigma-Aldrich
Anti-Desmina prediluit (Mouse)	1:50	IR606	Dako	Sheep-antimouse	Sigma-Aldrich
Anti-GAPDH (Mouse)	1:13000	G9295	Sigma-Aldrich	-	-
Anti-Actina Clon C4 (Mouse)	1:10000	MAB150IR	Sigma-Aldrich	Sheep-antimouse	Sigma-Aldrich

13.3. Protocols:

13.3.1. Immunofluorescència: Fer tot el procediment en una cambra humida.

1. Afegir 1ml de PBS1x (100mL de PBS10x + 900mL d'aigua destil·lada) i treure per aspiració.
2. Refixar amb 1ml de PFA4% 5 minuts a RT.
3. Rentar durant 5min amb PBS1x.
4. Submergir les *slides* en una solució freda de Metanol-Acetona 1:1 (prèviament preparada a -20°C, 25mL de Metanol i 25mL de Acetona) 5min a -20°C.
5. Rentar durant 5min amb 1XPBS.
6. Afegir 1ml de Solució de Bloqueig per *slide* durant 30min a RT.
 1. 8% BSA (0.8gr)
 2. 0.2% Tween20 (100µl Tween20 20%)
 3. en 1xPBS (10ml PBS1x)
7. Rentar durant 5min amb PBS1x.
8. Incubar amb 250µl d'anticòs primari amb *Blocking solution* (1:5) diluït amb PBS1x ON a 4°C (*Tapar amb parafilm*).

SB (1:5): 2mL de SB + 8mL PBS1x
9. Rentar 3 vegades durant 3min amb PBS1x.
10. Incubar amb 250µl d'anticòs secundari (1:500) amb *Blocking solution* (1:5) diluït amb 1XPBS durant 30 min a 4°C en fosc (*Tapar amb parafilm*).
11. Rentar 5 vegades durant 3min amb PBS1x.
12. Muntar amb 50µl de medi de muntatge.

13.3.2. Western Blot:

Preparació de les mostres:

1. Les mostres de teixit es van ficar en una solució de 1xSR (50µl).
2. Es van triturar amb un mini morter, i posteriorment es van portar a sonicar (es poden congelar al -80°C).
3. Es quantifica en el *Nanodrop*, i un cop sabem la quantitat (µg/µl) es calculen els µl(de 2xSSR/4xSSR+βmercaptoetanol) que es volen, per obtenir una concentració de 40µg.

Reactius:

PBS-T:

1. 900mL d'aigua MiliQ
2. 100mL de PBS10X
3. 100mL de Tween20 al 10%

Gel empilador al 10%:

1. 3,34 mL d'Acrilamida/Bis 30%
2. 2,5 mL de Tris 1,5M pH=8,9
3. 3.96 mL d'H₂O
4. 100µL de SDS 10%
5. 80µL de PA al 10%
6. 5µL de TEMED

Gel separador al 5%:

1. 1mL d'Acrilamida/Bis 30%
2. 1,5 mL de Tris 1,5M pH=8,9
3. 3.4 mL d'H₂O
4. 60µL de SDS 10%
5. 40µL de PA al 10%
6. 5µL de TEMED

Running Buffer 10X:

1. 144,2g de Glicina
2. 30,2g de Tris
3. 50mL de SDS 20%

Transfer Buffer(1L):

1. 2,93g de Glicina

2. 5,81g de Tris
3. 1,87mL de SDS 20%
4. 800mL d'aigua MiliQ
5. 200mL de Metanol al 20%

13.3.3. Perfusió:

Reactius:

Anestèsia intraperitoneal: (100µL x 10g/ ratolins)

1. 1 mL de Ketamina.
2. 0,8 mL Xylacina.
3. 8,2 mL d'aigua destil·lada.

NaCl al 0,9%:

1. Posem 9 grams de NaCl en 700mL d'aigua destil·lada.
2. Dissoldre bé el NaCl.
3. Afegir aigua destil·lada fins a 1L.

PFA (Paraformaldehid): **Fer tot el procediment dins de la campana

1. En un matràs aforat, afegir 500ml de H₂O destil·lada i escalfar fins a 60°C.
2. Afegir 40g de PFA.
3. Afegir 10ml de NaOH 1M i ajustar el pH a 7.
4. Escalfar al microones fins a 60°C evitant que bulli.
5. Afegir 100ml de PBS 10x i deixar a temperatura ambient.
6. Enrasar amb H₂O destil·lada fins a un volum total de 1l.
7. Ajustar el pH a 7.4.

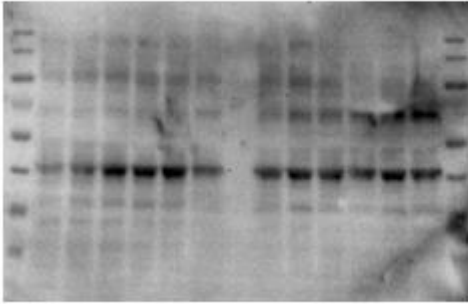
13.3.4. Fixació del cervell:

1. PFA 4% tota la nit.
2. Sacarosa 30% fins que precipiti (tota la nit).
3. Rentats: Primer amb PBS1x (5 min aprox.), PBS1x i OCT 1:1 (5 min aprox.) i amb OCT 100% (5 min aprox.)
4. Motlle: base amb OCT i 3-4 min a -80°C.
5. Cervell en el motlle: recte i amb els bulbs endavant.
6. Cobrir completament amb OCT i congelar a -80°C.

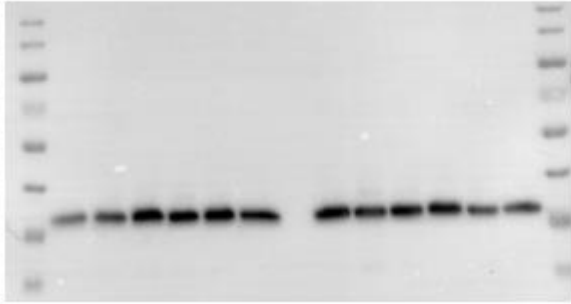
Reactius: **Sacarosa al 30% (guardar a 4°C)**: Posem 300 grams de sacarosa en 1L (1000gr) de PBS1x.

13.4. Westerns originals realitzats:

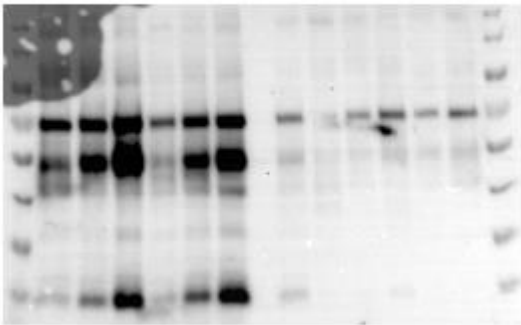
Western Blot de DMO:



Western Blot de GAPDH:



Western Blot de Glut-1:



Western Blot de Desmina:

